

(19)



(10) **LT 3973 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3973**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/12**

(21) Paraiškos numeris: **IP1631**

C07K 13/00

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 20**

A61K 37/02

A61K 37/43

C07K 15/00

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 05 27**

(60) SU duomenys: **PCT/US 92/00122, 1992 01 02**

(31, 32, 33) Prioritetas: **670085, 1991 03 15, US**

(72) Išradėjas:

Christie Ann Kelton, US

Shirley Vui Yen Cheng, US

Noreen Patrice Nugent, US

Rene Lynn Schweickhardt, US

(73) Patent savininkas:

**APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING NV, 6, John B. Gorsiraweg,
Curacao (AN), NL**

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

ATCC 68538, 68539, 68540, 68833, ATCC CRL 10921, US

(54) Pavadinimas:

Žmogaus folikulą stimuliuojančio hormono receptoriaus

(57) Referatas:

Šis išradimas apima išgrynintą žmogaus folikulą stimuliuojančio hormono (FSH) receptorių, jo fragmentą ar mutantą, kuris suriša FSH, minėto receptoriaus, fragmento ar mutanto kodavimą DNR, ekspresijos vektorius, turinčius minėtą DNR, transfekuotas minėtais ekspresijos vektoriais ląsteles, ir minėto receptoriaus, fragmento ar mutanto gavimo būdą, kultivuojant minėtas transfekuotas ląsteles. Šis išradimas taip pat apima farmacinės kompozicijas, turinčias minėtą receptorių, fragmentą ar mutantą, kaip pacientų gydymo tokiomis kompozicijomis metodą, leidžiantį sumažinti endogeninio FSH bioaktyvumą. Taip pat šiame išradime atskleidžiamas patobulintas žmogaus FSH nustatymo būdas, naudojant receptorių, jo fragmentą ar mutantą.

Šis išradimas susijęs su žmogaus folikulą stimuliuojančio hormono receptoriumi ir jo sinteze, naudojant rekombinantinės DNR metodus.

Folikulą stimuliuojantis hormonas (FSH) yra hipofizio veiklos heterodimerinis glikoproteininis hormonas, kuris siejasi struktūriniu panašumu su liuteinizacijos hormonu (LM) ir skydliaukės hormonu (TSH), kurie abu taip pat yra produkuojami hipofizyje ir chorioniniu gonadotropinu (CG), kuris produkuojamas placentoje. Hormonai yra santykinai dideli (28-38 kilodaltonai) ir yra sudaryti iš paprasto α subvieneto, nekovalentiškai surišto su atskiru β subvienetu, kas suteikia receptoriaus surišimo specifiškumą.

Ląsteliniai receptoriai šiems hormonams yra žinomi kaip membranos receptorių G baltymus surišančios klasės nariai, kurie, kai aktyvuoti, stimuliuoja adenilciklazės aktyvumo padidėjimą. To pasekoje išauga viduląstelinio transportinio adenozin-3', 5'-monofosfato (cAMP) lygis, ir tas įgalina steroidų sintezės ir sekrecijos padidėjimą. Pagal aminorūgščių sekų hidrofiliškumą ir hidrofobiškumą, išskirti trys pagrindiniai domenai: (1) hidrofilinė N-galo sritis, laikoma N-galo ekstraląstelinio domenu, (2) septyni hidrofobiniai segmentai membranoje, yra laikoma transmembraniniu domenu, ir (3) C-galo sritis, kurioje yra galimos fosforilinimo vietos (serino, treonino ir tirozino liekanos), laikoma C-galo viduląstelinio ar citoplazminio domenu. Glikoproteininio hormono receptorių šeima nuo kitų G baltymus surišančių receptorių, tokių kaip β 2-adrenergikai, rodopsinas ir K receptorius, skiriasi hidrofiliinio N-galo domeno, kuris dalyvauja hormono surišime, dideliu dydžiu.

FSH receptorius pasireiškia sėklidžių Sertoli ląstelėse ir kiaušidės granuliuotose ląstelėse. Pripažinta, kad reikalingas iš principo grynas žmogaus FSH receptorius, natūraliai gautų preparatų išgryninimas yra nepraktiškas ir neturėtų būti reikšmingas nustatant aminorūgščių seką. Neseniai viena grupė klonavo kDNR

koduojančią žiurkės FSH receptorių, nustatė aminorūgščių seką ir ekspresavo jį žinduolių ląstelėse (Sprengel, Mol. Endocrinol. 4:525, 1990). Kita grupė, bandant klonuoti TSH receptorių, atrodo, taip pat klonavo ir identifiko žmogaus FSH receptoriaus transmembraninės srities dalį (Parmentier, Science 246:1620, 1989).

Šis išradimas apima iš esmės gryną žmogaus FSH receptorių, jo fragmentą ar mutantą, kuris suriša FSH, minėtą receptorių, fragmentą ar mutantą koduojančia DNR, ekspresijos vektorius, turinčius minėtą DNR, transfekuotas minėtais ekspresijos vektoriais ląsteles, ir minėto receptoriaus, fragmento ar mutanto gavimo būdus, kultivuojant minėtas transfekuotas ląsteles. Šis išradimas taip pat apima farmacines kompozicijas, turinčias minėtą receptorių, fragmentą ar mutantą, kaip pacientų gydymo tokiomis kompozicijomis metodą, siekiant sumažinti endogeninio FSH bioaktyvumą. Taip pat šiame išradime atskleidžiamas patobulintas žmogaus FSH tyrimas, naudojant receptorių fragmentą ar mutantą.

Trumpas figūrų aprašymas.

Fig. 1 yra žmogaus FSH receptoriaus kDNR klonų žemėlapis. Parodytas nepilnas restrikcinės endonukleazės žemėlapis buvo nustatytas, derinant DNR sekų duomenis, gautus iš penkių klonų kiekvienos dalies. Yra pažymėtas 0.2 kb padidėjimas. Regionai, kuriems priklauso klonai, yra pažymėti ištisinėmis linijomis po restrikciniu endonukleazinių žemėlapiu. Klono pažymėjimas ir apytikslis dydis kilobazėmis yra pažymėti atitinkamai kairėje ir dešinėje kiekvienos ištisinės linijos pusėje. Apytikslis koduojamo baltymo amino-galinio ekstraląstelinio domeno, transmembraninio domeno ir karboksi-galinio viduląstelinio domeno išsidėstymas yra pažymėtas punktyrinėmis rodyklėmis virš restrikcinės endonukleazės žemėlapio. Intarpo pozicija (tikriausiai introno arba introno dalies) 5-10 klone yra pažymėta atvira dėžute.

Fig. 2A ir 2B vaizduoja strategiją, panaudotą "pilno ilgio" žmogaus FSH receptoriaus kDNR konstravime, siekiant, kad žinduolių ląstelių linijoje ekspresuotųsi koduojamas baltymas.

Fig. 3 yra ekspresijos vektoriaus plazmidės diagrama, panaudota išvesti CHO-DUKX ląstelių linijas stabiliai transfekuotas žmogaus FSH receptoriumi.

Fig. 4 yra ekspresijos vektoriaus plazmidės diagrama, panaudota išvesti Y1 ląstelių linijas stabiliai transfekuotas žmogaus FSH receptoriumi.

Fig. 5 iliustruoja viduląstelinius cAMP kiekius, matuotus CHO-DUKX ląstelių linijoje CHOHSR4Q-13, paveikus skirtingomis FSH (rutuliukai) arba LH (trikampiukai) dozėmis. Kiekvienas taškas atitinka vidutinę reikšmę. Standartinės paklaidos nurodytos vertikaliais brūkšniais.

Fig. 6 iliustruoja progesterono kiekius, išmatuotus Y1 ląstelių linijos Y1HSR4-38 kultūriniame skystyje, paveikus skirtingomis FSH dozėmis.

Vertikalūs brūkšniai žymi standartinę paklaidą, matuojant progesteroną po kiekvienos FSH dozės.

Išradime panaudotas žmogaus FSH receptorius, ir jo FSH surišantys fragmentai ar mutantai, remiasi polipeptidais, kurie sugeba atpažinti ir selektyviai susirišti žmogaus FSH ir kurie produkuoja nežymų imunologinį atsaką žmogaus organizme. Taigi, pateikiamas išradimas apima žmogaus FSH receptorių, turintį aminorūgščių seką atvaizduotą Seka ID Nr:2, ir taip pat kaip ir FSH-surišantys fragmentai ar mutantai, išlaiko labai aukštą homologiškumo laipsnį (identiškumas mažiausiai 95%), su pavaizduota aminorūgščių seka, ar bent su ekstraląsteline dalimi. Žmogaus FSH receptoriaus fragmentai, aprašomi šiame išradime, apima fragmentus, liekančius po to, kai citoplazminiai ir/arba transmembraniniai domenai yra nuskelti nuo viso polipeptido. Išradime ypač išskiriamas fragmentas yra N-galo ekstraląstelinė dalis, turinti maždaug nuo 1 iki 349 aminorūgščių, žmogaus FSH receptoriaus aminorūgščių sekos, atvaizduotos Seka ID Nr:2. Kadangi kelios kilpos apsukę transmembranines sritis (išvardintas sekančioje dalyje, Seka ID Nr:2) yra taip pat ekstraląstelinės, jos gali būti susijungę (pavyzdžiui per atitinkamas tarpines molekules) į fragmentus, turinčius aminorūgščių liekanų sekas N-gale

ekstraląstelinėje dalyje, tuo pagerindamos ryšį. Polipeptidai gali būti glikolizilinti, kaip kad yra natūraliuose receptoriuose arba gali būti dalinai ar pilnai deglikozilinti.

Yra manoma, kad tikrai dalis aukščiau aprašyto N-galo ekstraląstelinio domeno gali būti efektyviai panaudota FSH surišimui, kadangi labai tikėtina, kad pilnas eksraceliuliarinis domenas nėra būtinas šiam tikslui. Taigi, fragmentas kuris yra kažkiek trumpesnis, negu pilno ekstraląstelinio domeno 349 aminorūgštys, gali būti lengvai padaromas ir testuojamas, norint nustatyti efektyvų susirišimą su FSH. Tokia ilga, kaip ekstraląstelinės dalies FSH-surišanti sritis, išlieka nepažeista ir viso panaudojamo fragmento ilgis nėra lemiamas. Pagal šią nuostatą, taip pat tikimasi, kad rūgštys, kurios neinterferuoja, gali būti pridėtos prie bet kurio ekstraląstelinio domeno galo ar FSH-surišančio fragmento, nepakenkiant polipeptido FSH-surišimo sugebėjimui. Atsižvelgiant į tai, šis išradimas apima žmogaus FSH receptoriaus fragmentus, susidedančius iš ekstraląstelinio domeno dalių ir kurios išlaiko iš esmės tokias pačias FSH-surišimo savybes, kaip pilnas ekstraląstelinis domenas.

Aukščiau aprašytų receptorių ir fragmentų mutantinės formos yra taip pat šio išradimo sritis. Tokie mutantai apima nuo vienos iki dešimties aminorūgščių liekanų konservatyvius pakeitimus, ir tokių pakeitimų lokalizacija ir prigimtis buvo parinkta taip, kad nežymiai degradavo receptoriaus ar fragmento, kuris buvo modifikuotas, FSH-surišančios savybės.

Neaktyvuotas žmogaus FSH receptorius, fragmentas ar mutantas paruošiamas išskiriant ar klonuojant DNR, koduojamą kDNR ar genomine biblioteka, liguojant į DNR vektorių, transfekuojuojant į recipijento ląsteles tuo vektoriumi, kultivuojant transfekuotas recipijento ląsteles tokiose sąlygose, kurios įgalina receptoriaus, fragmento ar mutanto ekspresiją ir receptoriaus, fragmento ar mutanto išskyrimą iš kultūros.

DNR, kuri yra naudojama vektorių ekspresijai, gali būti genomo DNR ar kDNR, koduojanti žmogaus FSH receptorių ir gali turėti sritis padidinančias ekspresiją, tokias kaip intronai, promotoriai, sustiprintojai ir t.t. DNR gali būti lengvai modifikuota pakeičiant, iškerpant ar įterpian nukleotidus (pavyzdžiui,

specifinė vietos mutagenezė) taip, kad nepakentų ekspresuoto baltymo biologiniam ar FSH-surišimo aktyvumui. Pavyzdžiui, konservatyvūs pakeitimai (mutacijos) kurių metu yra pakeičiama nuo vienos iki dešimties aminorūgščių, gali būti padarytos nepakenkiant ekspresuoto baltymo (muteino) bendrai struktūrai ir aktyvumui. Analogiškai, tam tikros DNR dalys, tokios kaip dalys, kurios koduoja citoplazminius ir/arba transmembraninius domenų, gali būti iškirptos taip, kad tikrai vienas baltymo fragmentas, toks kaip tirpus ekstraląstelinis domenų, bus ekspresuojamas. Žmogaus FSH receptorių, FSH-surišimo fragmentas ar mutantas gali taip pat būti ekspresuojamas kaip sulietas baltymas. Toks sulietas baltymas, įjungus polipeptidą C-gale, suteiks savybes, įgalinančias palengvinti baltymo gryninimą ar išgryninto baltymo imobilizaciją ant kieto substrato, naudojamo FSH tyrimuose ar FSH gryninimo metodikoje. Kitas toks sulietas baltymas, įjungus nuskeltą polipeptidą N-gale, palengvins ekspresiją.

Pagal šį išradimą produkuojamas žmogaus FSH receptorių yra iš principo neaktyvuotas, turint galvoje, kad jis yra visiškai laisvas nuo papildomų biologinių agentų normaliai susijusių su FSH receptorių, išskirtu iš natūralių šaltinių, tokių kaip pavyzdžiui: bakterijų, virusų ir kitų baltymų. Receptorių gali būti įjungtas į farmacines kompozicijas, sumaišant su atitinkamais farmaciškai priimtinais nešikliais.

Paprastai, vaistinės kompozicijos gali būti paruošiamos įvesti oraliniu, parenteraliniu (įskaitant poodines, į raumenis ir intravenines injekcijas), vaginaliniu ir rektaliniu, transbukaliniu (įskaitant poliežuvinį), transdermaliniu ar intranazaliniu būdais. Kompozicijos, įvedamos parenteraliniu būdu, paprastai būna skysto tirpalo, dispersinės suspensijos ar emulsijos, geriau kai būna izotoninės; vaginaliniam ar rektaliniam naudojimui - kremo ar žvakutės pavidalo; oraliniam ar transbukaliniam naudojimui - kaip tabletės ar kapsulės; ir intranazaliniam įvedimui - miltelių, nosies lašų ar aerozolių pavidalo. Gali būti naudojamos įvairios lėto išsiskirstymo, implantuoto depo ar injekcinės dozinės formos. Siekiant kontroliuoti preparato

išnešiojimą po organizmą, aktyvusis komponentas gali būti taip pat inkorporuotas į polimerų matricas, liposomas ir mikrorutuliukus.

Šios kompozicijos gali būti suformuotos patogiomis vienetinėmis dozėmis ir taip pat gali būti paruoštos bet koku metodu, gerai žinomu farmakologijoje. Vaistinėse formose parenteraliniam įvedimui paprastu užpildu gali būti sterilus vanduo ar fiziologinis tirpalas, alkileno glikoliai -pvz. propileno glikolis, polialkilenglikoliai - pvz. polietileno glikolis, augalinės kilmės aliejus, hidrintas naftalenas ir pan. Vaistinės formos, skirtos vaginaliniam ar rektaliniam įvedimui, pvz. žvakutės, gali turėti užpildu pvz. poliakilenglikolius, vazeliną, kakao riebalus, ir pan. Vaistinės formos skirtos nazaliniam naudojimui gali būti miltelių pavidalo ir turėti tokius užpildus, pvz. laktozę ar dekstraną, taip pat gali būti vandeniniai ar aliejiniai tirpalai nosies lašų ar dozuojančių aerozolių pavidalo. Transbukaliniam naudojimui, tipiškai užpildai apjungia cukrų, kalcio stearatą, apdorotą krakmolą ir pan. Į tirpalą ar miltelių pavidalo vaistinę formą gali būti pridedama viena ar daugiau paviršiaus aktyvių medžiagų rūgščių ar druskų. Atitinkamos farmaciškai priimtinos paviršiaus aktyvių medžiagų druskos bus tokios, kurios išlaiko savybę padidinti peptidų absorbciją, kaip junginio, į kurį jos įjungiamos, savybę ir kurios nėra žalingos organizmui ar kaip kitaip kontraindukuojančios.

Įvedamo aktyvaus ingrediento dozė pagal įvedimo būdą ir dažnį, akivaizdžiai priklauso nuo paciento gydymo poreikio ir sąlygų, norimo pasiekti terapinio efektyvumo ir gydytojo sprendimų gydymo metu.

Farmacinės kompozicijos, į kurias įeina žmogaus FSH receptorius, FSH-surišantys fragmentai ar mutantai, gali būti įvedami pacientui terapiškai efektyviomis dozėmis tam, kad susirįštų su endogeniniu organizme cirkuliuojančiu FSH ir tokiu būdu kontroliuoti esamą bioaktyvaus FSH kiekį. Taigi, pateikiamo išradimo farmakologinės kompozicijos yra efektyviai naudojamos sumažinti endogeninio FSH bioaktyvumui. Pacientams moterims toks gydymo būdas gali būti efektyviai naudojamas sutrukdant folikulo augimą ir subrendimą, tuo būdu sutrukdant nėštumui. Pacientams vyrams toks gydymas gali būti efektyvus norint

sutrukdyti spermatogenezę. Iš dalies, atitinkamos formakologinės kompozicijos aukščiau aprašytiems tikslams turi žmogaus FSH receptoriaus fragmentą, kuris talpina N-galo ekstraląstelinį domeną ar paprastą dalį su įprastomis tokiomis pačiomis FSH-surišančiomis savybėmis.

Iš esmės grynas žmogaus FSH receptorių gali būti taip pat naudingai pritaikomas tradiciniuose FSH receptoriaus tyrimuose, tokiuose kaip pvz. Reichert, *Endocrinology* 94:483, 1974. Pagal pateikiamą išradimą, gauto gryno receptoriaus ar fragmento, surišančio FSH, pakeitimas žymiai pagerins tokių tyrimų lygį ir išdirbimą. Fragmentas, turintis N-galo ekstraląstelinį domeną ar FSH-surišantį fragmentą ir/arba sulietą baltymą gali taip pat imobilizuotis afiniškai siekiant išvalyti FSH iš skysčių, ekstraktų ir t.t.

Receptorių gali būti įkomponuotas į stabilių ląstelių liniją, geriau tam tikslui panaudojant eukariotinių ląstelių linijas, dar geriau - žinduolių ląstelių linijas, kurios stimuliuojamos receptoriaus, sugeba produkuoti išmatuojamą biologinį atsaką. Ląstelės atsako, esant FSH, išmatavimas tyrimo metu (pvz. testuojant serumą, plazmą, kultūrinę terpę, audinių homogenatą, ir t.t.) įgalins bioaktyvumo indikaciją ir tuo būdu suteiks galimybę naudoti labai patogų diagnostinį metodą. Tokios ląstelių linijos taip pat gali būti panaudojamos rūšiuojant chemines bibliotekas substancijoms, kurios gali sąveikauti su FSH receptorių ar testuojant peptidus ar mažus baltymus pagal jų sugebėjimą susiristi su FSH receptorių greitoje ekspreskryningo sistemoje. Kaip pavyzdys tokios sistemos yra tokia sistema, kur surištas ligandas rekombinantiniam FSH receptoriui, sąlygoja gamybą ar matuojamo produkto, tokio kaip cAMP ar progesterono, gamybos blokavimą. Tokia sistema gali būti toliau stiprinama efektyviai surišančiu ir lengvai išmatuojamu žymės elementu, pasižyminčiu bioluminescencija (pvz. liuciferazės genas) atsakančiu į receptoriaus signalą transdukcijos keliu (pvz. naudojant cAMP atsako elementą).

Iš esmės grynas žmogaus FSH receptorių, FSH-surišantys fragmentai ar mutantai taip pat gali būti panaudojami rentgeno spindulių kristalografijoje analizėje vystant molekulių modelius. Tokie modeliai naudojami nustatant tretinę

žmogaus FSH receptoriaus hormono-surišimo domeno struktūrą. Ši informacija įgalina pažvelgti į kontakto tarp FSH ir jo receptoriaus rūpimų sričių struktūrą, turint tikslą sukonstruoti peptidus, turinčius FSH agonistinį ar antagonistinį aktyvumą.

Siūloma rekombinantinė technika tinkanti pateikiamo išradimo baltymų ir DNR produkavimui, įskaitant identifikacinę atitinkamų mutacijų techniką, vektorius, recipijento ląsteles, kultivavimo sąlygas ir t.t., yra gerai žinomas kvalifikuotas būdas ir yra adekvačiai aprašyta pvz. US 4,761, 371 ir WO 88/09818, kurių ištraukomis čia remiamasi. Eksperimentų metodikos, kultivavimo terpė bakterijoms ir bakteriofagams, cheminiai tirpalai naudojami žemiau pateiktuose pavyzdžiuose, yra detalai aprašyti Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2 red., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, jeigu atskirai nenurodyta.

1 pavyzdys. Žmogaus FSH receptoriaus kDNR klonų izoliavimas ir charakterizavimas

Bibliotekos parinkimas

Žiurkių FSH receptoriaus kDNR klonas panašus į tą, kuris aprašytas Sprengel'io, Mol. Endocrinol. 4:525, 1990, buvo gautas iš dr. William'o Moyle, Medicinos ir Stomatologijos Universiteto New Jersey Robert Wood Johnson Medicinos Mokyklos. Šis kDNR klonas buvo įterptas į SV40 vėlyvosios ekspresijos vektorių pSVL (Pharmacia LKB, produkto numeris 27-4509-01) ir pavadintas pSVLFSHR. 2.1 kb DNR fragmentas, turintis regioną, atitinkantį pilną FSH receptoriaus baltymą koduojantį regioną, buvo iškirptas iš plazmidės naudojant restrikcinių endonukleazų saitus Xba1 ir BamH1. Iškirpta DNR buvo frakcionuota pagal dydį gel-elektroforezės metodu, o 2.1 kb žiurkių FSH receptoriaus fragmentas elektroliujuotas iš gelio. Šiuo išgrynintu DNR fragmento bandiniu atrinktos bibliotekos identifikuojant žmogaus FSH receptoriaus kDNR klonus.

λ gt11 kDNR biblioteka, sukonstruota iš ekstrahuotos iš žmogaus sėklidžių RNR, buvo nupirktą iš Clontech, Palo Alto, CA (katalogo numeris HL1010b) ir buvo amplifikuota prieš panaudojant. Dvidešimt amplifikuotos bibliotekos alikvotų, ekvivalenčių maždaug 7.5×10^4 lizės vienetams (plaque forming units - pfu), buvo adsorbuota į 0.5 ml E.coli Y1088 kamieno suspensijos gazoną. Suspensija buvo paruošta, auginant per naktį Y1088 kultūrą 37°C NZYM arba LB, kuri papildyta 0.2% maltozės ir 10 mM MgSO₄, surenkant ląsteles ir po to suspenduojant jas 10 mM MgSO₄ iki O.D.₆₀₀ 0.5. Apie 6.5 ml išlydytos NZYM agarozės (0,7%), esant 48°C, buvo pridėta į kiekvieną fago/ląstelės suspensiją, ir gautas mišinys supiltas ant vienos iš dvidešimties 150 mm NZYM agaro lėkštelių (pašildytos iki 42°C). Bendras fagų, užneštų pirminiam atrinkimui, kiekis buvo apie 1.5×10^6 . Inkubuojama 4 val. 42°C, po to kelias val. atšaldoma 4°C, ir kiekvienos lėkštelės kopija buvo padaryta ant nitroceliuliozinio filtro (Millipore) pagal Benton'o ir Davies'o procedūras (Science, 196:180, 1977). Feinberg'o ir Vogelstein'o atsitiktinių oligonukleotidų-pradmenų procedūra (Anal. Biochem. 137:266, 1983) buvo panaudota generuoti nuo žiurkių FSH receptoriaus DNR fragmento šablono, aprašyto ankstesniame paragrafe, ³²P pažymėtą bandinį, kurio specifinis aktyvumas $1-2 \times 10^9$ cpm/μg. Fago dublikatų ant nitroceliuliozės filtro prehibridizacija atlikta 37°C, apie 6 val. buferyje, kuriame yra 50% formamido, 5x SSC (1 x SCC yra 0.15 M natrio chloridas, 0.015 M natrio citratas), 20 mM natrio fosfato buferio, pH 7.2, 10xDenhardt'o reagento (50xDenhardt'o reagentas yra 1% Fikolo, 1% polivinilpirololidono ir 1% BSA) ir 100 μg/ml tRNR. Filtrų hibridizacija atlikta tame pačiame buferyje, išskyrus tai, kad buvo pridėta žiurkių FSH receptoriaus DNR bandinio iki maždaug 3×10^6 cpm/ml koncentracijos.

Denatūruota plazmidinė DNR buvo neutralizuota ir išsodinta etanolio, pridedant 7.5 μl 7.5 M amonio acetato ir 110 μl 100 % etanolio ir atšaldant mišinį skystame azote. Išsodinta DNR buvo surinkta centrifuguojant mikrofugoje 10 min. DNR nuosėdos plautos 70 % etanolio ir išdžiovintos. Sekvenavimo reakcijos atliktos su DNR polimeraze - Sekvenaze T7 (United States Biochemical), remiantis

gamintojų instrukcijomis. Preliminarios sekvenavimo reakcijos atliktos su pUC18 polilinkerinio regiono tiesioginiais ir atvirkštiniais praimeriais (Pharmacia LKB). Gauti duomenys naudojami žmogaus FSH receptoriaus specifiniams sekvenavimo praimeriams sukurti. Praimeriai buvo sintezuoti arba 391 Applied Biosystems modelio DNR sintezatoriumi, arba užsakyti iš National Biosciences, Inc., Hamel, MN. Keletas DNR sekvenavimo duomenų buvo gauti, sublokuojant pirminių klonų mažesnius restriktinės endonukleazės fragmentus į pUC18 ir pakartojant sekvenavimo reakcijas su tiesioginiais ir atvirkštiniais praimeriais.

Preliminaraus sekvenavimo duomenys parodė, kad nė viena iš penkių izoliuotų kDNR neišreiškia pilno ilgio žmogaus FSH receptoriaus baltymą koduojančio regiono, bet, kombinuojant klonų sekvenavimo duomenis, padaroma išvada apie pilną baltymo seką. Penkių klonų giminingų vietų, lyginant su pilna žmogaus FSH receptoriaus kDNR seka, schematinė diagrama parodyta Fig.1. Pilna žmogaus FSH receptoriaus kDNR seka, gauta kombinuojant klonų persidengiančias sekas, panaudojus Genetics Computer Group (GCG) fragmentų apjungimo kompiuterinę programą, yra atvaizduota kaip seka ID Nr:1, o iš jos gauta aminorūgščių seka kaip ID Nr:2. Išanalizavus žmogaus FSH receptoriaus DNR seką, identifikuojamas ilgas atviras skaitymo rėmelis (ORF) iš 2085 nukleotidų, kurie koduoja 695 aminorūgščių baltymą. Taigi žmogaus FSH receptorius yra 3 am.r. ilgesnis negu žiurkės. Bendras procentinis identiškumas tarp žiurkės ir žmogaus FSH receptoriaus DNR ir baltymo sekų buvo nustatytas, panaudojus GCG Bestfit programą, ir yra 87% bei 90% atitinkamai. Ekstraląstelinė žmogaus FSH receptoriaus N-galo hidrofiliinė dalis yra 349 am.r. ilgio ir yra 87% identiška su atitinkamu žiurkės FSH receptoriaus regionu. Dviejų rūšių septyni membraniniai regionai, sujungti trimis ekstraląstelinėmis ir trimis viduląstelinėmis kilpomis, yra identiški 95%, o C-galo viduląsteliniai regionai yra identiški 81%. Nepilna aminorūgščių seka publikuota Parmentier, Science 246: 1620 - 1622, 1989, atitinka sekos ID Nr:2 aminorūgštis nuo 399 iki 525.

5-10 klono variante už T nukleotido, 448 pozicijoje, ID Nr:1 sekoje yra 0.25 kb intarpas. Jo DNR seka nebuvo panaši į kurią nors žiurkės arba žmogaus FSH

receptoriaus DNR dalį, o taip pat nebuvo panaši į kurią nors žinomą seką, esančią Genbank arba EMBL DNR sekų duomenų bazėse. Atitinkamas 11-11 klonų regionas neturėjo šio intarpų. LH receptoriaus kDNR klonai, izoliuoti iš žmogaus skydliaukės kDNR bibliotekos, turi panašius atvejus (Frazier, Mol. Endocrinol. 4:1264-1276, 1990). Šie atvejai, matyt yra kilę iš nepilnai ir/arba neteisingai sujungtų iRNR molekulių. 3' sujungimo pastovi seka (CAG'G) intarpų 5-10 gale akivaizdžiai patvirtina šį paaiškinimą.

pUC18 plazmidės, turinčios 11-11 (pavadintas pHFSHR11-11), 15-6 (pavadintas pHFSHR15-6) ir 5-10 (pavadintas pHFSHR5-10) kDNR intarpus, buvo deponuotos American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, 1 kovo, 1991 ir gavo papildomus numerius ATCC68538, ATCC68540 ir ATCC68539 atitinkamai. Deponavimas buvo atliktas pagal visus Budapešto Sutarties reikalavimus.

2 pavyzdys. Vektorių, ekspresuojančių pilną žmogaus FSH receptorių žinduolių ląstelėse, konstravimas

Žmogaus FSH receptoriaus DNR, kuri ekspresuojasi žinduolių ląstelėse, konstravimo strategija parodyta Fig. 2A ir 2B. Atsižvelgiant į Fig. 2A, 5' 691 bazių porų (bp) NsiI-BamHI fragmentas, kurio pradžia ATG, buvo išgrynintas iš pHFSHR11-11 ir subklonuotas į pUC18, kuri restriktuota su PstI ir BamHI. Gauta plazmidė pHFSHR11-11nb buvo linearizuota su SphI. Galai užbukinti, veikiant DNR polimerazės 1 Klenovo fragmentu (New England Biolabs, Beverly, MA). Ligavus XhoI linkerius (New England Biolabs, Beverly, MA) su užbukintais galais, mišinys buvo restriktuotas su XhoI bei BamHI ir maždaug 700 bp žmogaus FSH receptoriaus 5' fragmentas buvo išgrynintas gelfiltruojant. Fragmentas iš žmogaus FSH receptoriaus kDNR regiono vidurio buvo izoliuotas iš pHFSHR11-11, iškerpant su BamHI bei SphI ir išgryninant gelfiltracija atitinkamą 734 bp fragmentą. 3' žmogaus FSH receptoriaus fragmentas, turintis iš TAA stop kodoną, buvo izoliuotas iš pHFSHR15-6, pirmiausia, kerpanant plazmidę Dra3, po to užbukinant galus DNR polimeraze T4. XhoI linkeriai buvo liguoti su užbukintais

galais ir gautas mišinys restriktuotas Sph1 bei Xho1, o 3' 690 bp (maždaug) Sph1-Xho1 fragmentas izoliuotas ir išgrynintas.

Atsižvelgiant į Fig. 2B, 5' 700 bp Xho1-BamH1 ir vidurinis 734 bp BamH1-Sph1 žmogaus FSH receptoriaus kDNR fragmentai buvo subklonuoti į pUC18-Xho1 (sukurtas šioje laboratorijoje, pakeitus pUC18 polilinkeryje Sma1 saitą į Xho1 su Xho1 linkeriais), kuri kirpta su Xho1 ir Sph1. Gauta pHFSHR1. 4xs plazmidė buvo kirpta su Xho1 ir Sph1. Sukarpyta DNR buvo elektroforetiškai frakcionuota pagal fragmentų dydį 5-6% poliakrilamidiniame gelyje, ir maždaug 1400 bp fragmentas, turintis 5' ir vidurinį žmogaus FSH receptoriaus DNR regionus, buvo išpjautas ir išgrynintas elektroliujuojant. 3'Sph1-Xho1 fragmentas, turintis TAA stop kodoną, buvo subklonuotas į pUC18-Xho1, kuri kirpta su Xho1 ir Sph1. Gauta pHFSHR1.4xs plazmidė buvo kirpta su Xho1 ir Sph1. Sukarpyta DNR buvo frakcionuota 5-6% poliakrilamidiniame gelyje, o maždaug 700 bp turintis gabalas išpjautas ir išgrynintas elektroliujuojant. Pilnas žmogaus FSH receptorių koduojantis regionas buvo surinktas, kombinuojant 5' 1400 bp Xho1-Sph1 fragmentą su 3'700 bp Sph1-EcoR1 fragmentu bei liguojant su pUC18-Xho1, kuri kirpta su Xho1 ir EcoR1. Teisingas konstrukcijos, pavadintos pHFSHRX, surinkimas patikrintas, kerpant endonukleaze bei sekvenuojant DNR. Pilnai sukonstruotas žmogaus FSH receptoriaus 2.1 kb Xho1 fragmentas, dar turintis maždaug 18 bp 5' ir 12 bp 3' nekoduojančias sekas, buvo iškirptas iš pHFSHRX su Xho1. Sukarpyta DNR buvo frakcionuota pagal dydį elektroforetiškai 0.7% agaroziniame gelyje. 2.1 kb Xho1 fragmentas buvo išpjautas iš gelio, išgrynintas elektroliujuojant Little Blue Tank™ (ISCO), panaudojus gamintojų rekomenduojamą procedūrą, ir įterptas į Xho1 klonavimo saitus žinduolių ląstelių ekspresinėse vektorinėse plazmidėse. Plazmidės, turinčios tinkamos orientacijos tarpą žmogaus FSH receptoriaus iRNR transkripcijai, buvo atrinktos pagal restriktinės endonukleazės fragmentų analizę. Prieš įvedant į žinduolių ląsteles, ekspresijos vektoriaus plazmidės DNR buvo išgryninta arba dviem vienas po kito sekančiais centrifugavimais cezio chlorido

tankio gradiente, arba panaudojus rinkinį plazmid maxi kit (Qiagen Chatsworth, CA) remiantis gamintojų protokolu.

Bet kuris tinkamas žinduolių ląstelėse besiekspresuojantis vektorius gali būti panaudotas žmogaus FSH receptoriaus ekspresijai. Vektorinės plazmidės būtini komponentai apima: eukariotinį promotorių, pavyzdžiui, pelės metalotioneino 1 (MMT-1) promotorių, Rauso Sarkomos Viruso promotorių arba SV40 ankstyvąjį ar vėlyvąjį promotorius, kuriais valdoma žmogaus FSH receptoriaus iRNR transkripcija; markerinį geną, pavyzdžiui, atsparumo neomicinui geną (Neo), dihidrofolatreduktazės (DHFR) geną arba daugybinio atsparumo (multidrug resistance) geną (MDR), kurių pagalba atrenkamos transfekuotos ląstelės; poliadenilinimo signalą (poly A), pavyzdžiui, ankstyvąjį SV40 poliadenilinimo regioną, skirtą receptoriaus RNR transkripto brandinimui; ir bakterinę replikacijos pradžią bei atsparumo antibiotikui geną, pavyzdžiui pBR322 ori ir atsparumo ampicilinui geną, įgalinančius vektorinės plazmidės augimą ir dauginimąsi tinkančiame E.coli kamiene. Keletui ląstelių linijų gali būti svarbus intronas, kuris yra regione transkribuotame į žmogaus FSH receptorių koduojančią RNR. Pageidautina, kad intronas būtų tarp promotoriaus ir žmogaus FSH receptoriaus kDNR intarpo, dėl to jis yra 5' netransliuojamame žmogaus FSH receptoriaus RNR transkripto regione. Gali būti panaudotas bet kuris tinkamas intronas. Mūsų eksperimentuose naudotas intronas buvo žmogaus glikoproteino geno α subvieneto 2 kb Xba1-Pst1 introno A dalis (Fiddes, J. Mol. Appl. Genet. 1:13, 1981) Ekspresijos vektoriuose jis įterptas tarp MMT-1 promotoriaus regiono ir žmogaus FSH receptoriaus kDNR fragmento. Sutrumpintas intronas išlaikė endogeninę jungtį, bet jungties donoras buvo kompensuotas sintetiniu oligonukleotidu.

Žmogaus FSH receptoriaus ekspresinio vektoriaus, panaudoto CHO ląstelėms transfekuoti pD α HFSHRx (žmogaus FSH receptorių, esantis CLH3AXSV2DHFRh α IVS), diagrama parodyta Fig. 3, o žmogaus FSH receptoriaus ekspresijos vektoriaus, panaudoto stabilizuoti transfekuotas Y1 ląsteles pN α HFSHRx (žmogaus FSH receptorių, esantis CLH3AXSV2NEOh α IVS),

diagrama parodyta Fig. 4 MMT-1 geno sekos (nukleotidai 4542-7514 Fig. 3, nukleotidai 5192-8164 Fig. 4), kurios turi promotorinį regioną, yra tokios pat kaip konstrukcijos CLH3X 5' kryptimi XhoI saite (Reddy, DNA 6:461 1987). Žmogaus glikoproteino geno α subvieneto geno introno A fragmentas, aprašytas ankstesniame paragrafe, yra tarp nukleotidų 7514 bei 9514 Fig. 3 ir tarp nukleotidų 8164 bei 10164 Fig. 4 3' kryptimi. Nuo XhoI saito MM-1 intronai ir poliadenilinimo signalo sekos buvo pašalintos ir pakeistos ankstyvuoju SV40 poliadenilinimo regionu (nukleotidai 11614-11857 Fig. 3, nukleotidai 12264-12508 Fig. 4). pML regione (Lusky, Nature 293:79, 1981) yra bakterijos replikacijos pradžia ir atsparumo ampicilinui genas iš pBR322 (nukleotidai 1925-4542 Fig.3, nukleotidai 2575-5192 Fig.4). DHFR geno transkripcijos vienetas (nukleotidai nuo 1 iki 1925 Fig.3), kuris turi pelės DHFR kDNR ir SV40 ankstyvojo promotoriaus regioną, mažąjį T introną ir poliadenilinimo ankstyvojo regiono sekas, priklauso PvuII-BamHI fragmentui, kuris yra pSV2DHFR (Subramani, Mol. Cell. Biol. 1:854, 1981). PvuII saitas buvo pakeistas BamHI saitu, prieš įterpant fragmentą į ekspresinio vektoriaus plazmidę. Neo geno transkripcijos vienetas (nukleotidai 1-2575 Fig. 4) buvo surinktas, pakeičiant DHFR kDNR (nukleotidai 342-1077 Fig. 3) 1385 bp HindIII-SmaI fragmentu iš pSV2-neo (Southern, J. Mol. Appl. Genet. 1:327, 1982). SmaI saitas buvo pakeistas į BamHI saitą, prieš įterpant fragmentą į ekspresijos vektoriaus plazmidę.

pN α hFSHRX plazmidė gali būti panaudota ilgiau besidauginančių žinduolių ląstelių transfekcijai, ir buvo deponuota su ATCC lapkričio 19, 1991, su papildomu numeriu ATTC68833. Deponavimas buvo atliktas pagal visus Budapešto Sutarties reikalavimus. pD α hFSHRX plazmidė labiausiai tinka transfekuoti ląstelių linijas, kurios nepasižymi dihidrofolatreduktaziniu (DHFR) aktyvumu.

DNR klonavimo ir kostravimo technikos gali būti panaudotos žmogaus FSH receptoriaus DNR ekspresinės konstrukcijos modifikavime, taip kad FSH-surišantys fragmentai yra koduojami. Šie modifikuoti DNR fragmentai gali būti įterpti į ekspresijos vektorius, pavyzdžiui, aprašytus čia ir naudotus žinduolių ląstelių

trasfekcijai. Išaugusios linijos sekretuotų tirpius žmogaus FSH-surišančio receptoriaus fragmentus, tokius kaip amino-galinį ekstraląstelinį domeną arba jo FSH-surišantį fragmentą.

3 pavyzdys. Žinduolių ląstelių linijų išvystymas, kurios stabiliai ekspresuoja funkcionalų žmogaus rekombinantinį FSH receptorių arba jo FSH surišantį fragmentą, kuris gali būti ir pakitęs

Tinkamos žinduolių ląstelių linijos, kurios galėtų ekspresuoti rekombinantinį žmogaus FSH ir jo darinius, apima kinietiško žiurkėno kiaušidės (CHO), pelės adenokarcinomą Y1, žiurkės hipofizę GH₃, žmogaus pieno liaukos karcinomą MCF7 ir žmogaus embriono inkstą 293. Y1 ir CHO ląstelių panaudojimas yra aprašytas šiame pavyzdyje.

Y1 ląstelės yra klonalinis steroidus sekretuojantis ląstelių kamienas, paimtas iš pelės antinksčio žievės auglio (Yasumura, Cancer Res. 26:529-536, 1966). Šios ląstelės buvo gautos iš ATCC ląstelių banko (ATCC CCL 79) ir panaudotos kaip kultūra, auginant Ham'o F10 terpėje, papildytoje 15 % arklio serumu (HS), 2,5% FBS ir 1% L-glutaminu (Y1 auginimo terpė).

CHO-DUKX yra CHO ląstelių kloninis mutantas, neturintis dihidrofolatreduktazinio aktyvumo (Urlaub G. and Chasin, L.A. PNAS 77: 4216-4220, 1980). Ląstelės buvo augintos minimalioje terpėje Alpha (MEM- α), papildytoje 10% FBS ir 1% L-glutaminu (Y1 auginimo terpė).

Visos ląstelės augintos 37°C, 5% CO₂, sudrėkintoje atmosferoje.

Trasfekcija kalcio fosfatu

Panaudotas transfekcijos protokolas buvo jau publikuoto metodo (Graham, Virology 52:456, 1973) modifikacija. Maždaug 24 val. prieš transfekciją ląstelės buvo patalpintos į 100 mm diametro lėkšteles: tankis 7×10^5 ląstelių/lėkštei (CHO-DUKX) arba 1×10^6 ląstelių/lėkštei (Y1).

Atliekant transfekciją, 10 μ g vektorinės plazmidinės DNR (pD α HFSHRX CHO-DUKX ląstelėms, pN α HFSHRX Y1 ląstelėms) buvo pridėta į 0.5 ml. transfekcijos

buferio. Transfekcijos buferis buvo paruoštas, maišant 4 g NaCl, 0.185 g KCl 0.05 g Na₂PO₄, 0.5 g dekstrozės ir 2.5 g HEPES steriliame, distiliuotame vandenyje ir pridedant tūrį iki 500 ml, o pH iki 7.5. Į DNR/transfekcijos buferio mišinį buvo pridėta 31 µl 2 M CaCl₂. Tirpalas buvo sumaišytas ir paliktas kambario temperatūroje 45 min., tam kad susidarytų DNR nuosėdos, kurios buvo užsluoksniuotos ant ląstelių, pašalinus kultūrinę terpę. Po 20 min., esant kambario temperatūrai, buvo pridėta 5 ml atitinkamos auginimo terpės ir ląstelės kultivuotos 6 valandas. Terpė pašalinama, o ląstelės purtomos 3.5 min. 34 ml transfekcijos buferio, kuriame yra 15% glicerolio. Ląstelės dukart plaunamos PBS buferiu prieš pridedant 10 ml auginimo terpės. Maždaug 48 val. po transfekcijos CHO-DUKX ląstelės buvo kultivuotos iki 1:10 paviršiaus ploto, o po to pridedama selektyvi terpė. Y1 ląstelės augo 72 val. po transfekcijos iki 1:5 užimamo ploto, prieš pridedant selektyvios terpės. CHO-DUKX ląstelių selektyvią terpę sudaro MEM-α be ribonukleozidų ir dezoksiribonukleozidų, papildyta 10% dializuotu FBS, 1% L-glutaminu bei 0.02 µM metotreksatu (MTX). Y1 ląstelių selektyvią terpę sudaro Y1 auginimo terpė su 80 µg/ml G418. MTX-atsparios CHO-DUKX ląstelių kolonijos bei G-418-atsparios Y1 ląstelių kolonijos susiformavusios maždaug po 2-3 savaičių, buvo individualiai atrinktos ir kultivuotos iki tokio ląstelių kiekio, kuris buvo pakankamas konservuoti užšaldant bei testuoti hormoninį atsaką.

Žmogaus rekombinantinio FSH receptoriaus bioktyvumo stabiliose transfektuose CHO ląstelėse demonstravimas

Siekiant nustatyti, ar sukonstruota kDNR koduojanti receptorių gali produkuoti baltymą, kuris būtų biologiškai aktyvus stabiliose transfektuose CHO ląstelėse, MTX-atsparios CHO ląstelių kolonijos buvo paveiktos žmogaus rekombinantiniu FSH ir buvo išmatuotas viduląstelinis cAMP. Tiriant cAMP, ląstelės buvo kultivuojamos CHO ląstelių selekcinėje terpėje, 12-os šulinėlių plokštelėse su 2.5x10⁴ ląstelių/šulinėlyje koncentracija. Po 72 kultivavimo valandų, kiekvienas šulinėlis buvo praplautas 1.5 ml šilta auginimo terpe. Į kiekvieną

praplautą šulinėlį buvo pridėta 300 μ l auginimo terpės be serumo, kurioje yra 0.1 mM 3-izobutil-1 metilksantino (Sigma). Po 15 min. inkubavimo, žmogaus rekombinantinis FSH buvo pridėtas į terpę kiekviename šulinėlyje taip, kad galutinė koncentracija apytiksliai buvo 335 ng (2413 mIU/ml). po 30 min. inkubavimo, bandymas buvo nutrauktas ląsteles paveikiant keturiais greito sušaldymo-atšildymo ciklais. 50 μ l alikvoto iš kiekvienų ląstelių lizato pernešta į 1,5 ml mėgintuvėlius norint nustatyti baltymo kiekį. Šaltas etanolis (300 μ l) buvo pridėtas į kiekvieno lizato pavyzdį prieš pernešant į 1.5 ml centrifugavimo mėgintuvėlius. Visi lizatų pavyzdžiai buvo centrifuguoti 13,000xg 15 min. tam, kad atskirti ląstelių nuolaužas. Bendras ištirpusių baltymų kiekis buvo nustatomas naudojant baltymų nustatymo rinkinį Bio-Rad (katalogo Nr 500-0002) pagal gamintojo metodiką. Etanoliu apdoroti lizato pavyzdžiai buvo liofilizuoti alikvotomis po 5-100 μ l, ir suspenduojami 100 μ l matavimo buferinio tirpalo iš Dupont/NEN Medical Products cAMP matavimo rinkinio (katalogo Nr. NEK-033). cAMP kiekis suspenduoto lizato pavyzdžiuose buvo nustatytas naudojant radioimuninę metodiką pateiktą kartu su rinkiniu. Pavyzdžiai tyrimui nebuvo praskiesti. Daugumoje žmogaus FSH receptoriaus-transfekuotų CHO ląstelių linijų, aukšti viduląstelinio cAMP lygiai buvo išmatuoti po FSH stimuliacijos, lyginant su kontrole (netransfekuotos CHO-DUKX ląstelės transfekuotos su CLH3AXSV2DHFRh α IVS). Vidutinis atsakas buvo apie 16-kartų didesnis, negu kontrolėse.

Viena neklonuota ląstelių linija CHO_HFSHR4Q-13, buvo parinkta hormono atsako, priklausomai nuo dozės, analizei. Procedūra buvo panaudota ta pati, kaip ankstesniame paragrafe, išskyrus tai, kad ląstelės buvo apdorotos žmogaus rekombinantiniu FSH ar LH, 0-10,000 mIU/ml koncentracija. Kiekviena dozė buvo analizuojama po tris pakartojimus. Produkuojamo viduląstelinio cAMP kiekis buvo išreikštas nanomoliais/miligrame (n mol/mg) tirpaus baltymo ir nubraižytas grafikas prieš FSH ar LH koncentraciją, norint gauti atsako priklausomybės nuo dozės, kreivę. Atsako nuo FSH ir LH dozės kreivės parodytos Fig. 5. Pagal rezultatus matyti, kad CHO_HFSHR4Q-13 ląstelių linija demonstruoja didžiulį išaugimą

viduląstelinio cAMP, kaip atsako į stimuliaciją FSH, bet ne į LH. Pusiaus maksimali stimuliacija FSH (ED₅₀) vyksta esant FSH dozei 144 mIU/ml. Žmogaus FSH receptoriaus kDNR gali būti naudojama produkuoti biologinį funkcionalų žmogaus FSH receptoriaus baltymą CHO ląstelėse, įgalinantį ląsteles tarpininkauti specifiniam cAMP atsakui į FSH, bet ne į LH.

Žmogaus FSH receptoriaus kiekis CHO^hFSHR4Q-13 linijoje, ar panašioje linijoje, kuri produkuoja žmogaus rekombinantinį FSH receptorių ar FSH-surišančius fragmentus ar mutantus, gali didėti, veikiant ląsteles palaipsniui didėjančia MTX koncentracija. Tas įtakoja amplifikaciją DHFR kDNR kopijų skaičiaus išilgai prisijungimo sekos, kuri turi žmogaus FSH receptoriaus kDNR ir tiesiogiai didina koduojamo baltymo sintezę. Tai galima atlikti, jeigu reikalinga, norint padidinti tyrimo jautrumą. Taip pat žinduolių ląstelės, kurios ekspresuoja aukštą žmogaus FSH receptoriaus, FSH-surišančių fragmentų ar mutantų lygį, gali būti naudojamos žmogaus FSH receptoriaus baltymo gamybai, terapiniams ar radioimuniniams tyrimams.

CHO^hFSHR4Q-13, ar panaši linija, gali taip pat būti panaudojama tyrimuose įvertinant *in vitro* farmacinių preparatų, turinčių FSH, ar į FSH panašias substancijas, bioaktyvumą. Minėtas genas toks kaip liuciferazė, gali būti efektyviai surištas su cAMP ir cAMP lygio padidėjimas gali būti tiesiogiai išmatuojamas neradioaktyviu metodu, tokiu kaip bioluminescencija, kuri suteikia galimybę išmatuoti FSH bioaktyvumą.

CHO^hFSHR4Q-13 linija buvo deponuota su ATCC 1991 lapkričio 19, kaip papildomas numeris ATCC CRL 10921. Deponavimas buvo atliktas pagal visus Budapešto Sutarties reikalavimus.

Rekombinantinio žmogaus FSH receptoriaus bioaktyvumo stabiliose transfektuotose pelės antinksčių Y1 ląstelėse demonstravimas

Norint nustatyti, ar sukonstruota žmogaus FSH receptoriaus kDNR konstrukcija gali produkuoti baltymą, kuris būtų biologiškai aktyvus stabiliose

transfekuotose Y1 ląstelėse, G418-atsparios Y1 ląstelių kolonijos buvo paveiktos žmogaus rekombinantiniu FSH ir kultivuotos kultūrinėje terpėje, siekiant nustatyti progesterono kiekį. Progesterono nustatymui, ląstelės buvo kultivuojamos 6 šulinėlių plokštelėse (35 mm diametro šulinėlis), esant 4×10^5 ląst/šulinėlyje tankiui, Y1 selekcinėje terpėje. Po dviejų dienų kultivavimo, Y1 ląstelių terpė buvo pašalinta ir pakeista 3 ml Ham'o F10 terpe, kurioje yra 5% arklio serumo, 0.8% jaučio serumo, 1% L-glutamino ir 80 µg/ml G418. Po vienos dienos inkubacijos, terpė buvo pašalinta ir ląstelės du kartus praplautos 2ml Ham'o F10 terpe su 1 mg/ml BSA (V frakcija), 1% L-glutamino ir 80 µg/ml G418 (tyrimo terpe). Šiame etape vidutinis ląstelių skaičius šulinėlyje buvo nustatomas kiekvienai ląstelių linijai, pašalinant ir suskaičiuojant ląsteles iš trijų testuojamų šulinėlių. Ląstelės po to buvo kultivuojamos 4 val. su 1 ml tiriamosios terpės, turinčios 100 IU/ml žmogaus rekombinantinio FSH. Po inkubacijos, kultivavimo lėkštelės patalpinamos į ledą, iki to laiko, kol kultūrinė terpė iš kiekvieno šulinėlio buvo pernešta į stiklinius 12x75 centrifugavimo mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai su kultūriniu terpe buvo patalpinti į verdančio vandens vonią 10 min., po to centrifuguoti 1100xg, 4°C temperatūroje. Supernatantai pernešti į švarius 12x75 stiklinius mėgintuvėlius ir laikomi -20°C per naktį. Progesterono lygis išmatuotas naudojant Serono Diagnostics Progesterone MAIA, produkto Nr12274, platinamas Ciba Corning, Medfield, MA. Tyrimai buvo atlikti pagal gamintojo pateiktas instrukcijas, išskyrus tai, kad kultūrinės terpės pavyzdžiai ir progesteronas standartinei kreivei buvo skiedžiami PBS, turinčiu 0.1% BSA ir 0.6% natrio azido, vietoje skiesto buferio, kuris būna rinkinyje. Progesteronas standartinei kreivei buvo gautas iš CalBiochem (kat Nr 5341) ir prieš naudojimą buvo skiestas 100% etanoliu iki 15 µg/ml koncentracijos. Išeiginis tirpalas buvo laikomas -70°C temp. Progesterono standartinės kreivės praskiedimų galutinės koncentracijos buvo tokios pačios, kokios rekomenduojamos rinkinyje. Po praskiedimo progesterono standartiniai tirpalai išliko stabilūs, laikant vieną savaitę 4°C.

Keletas FSH apdorotų Y1 linijų, stabiliai transfekuotų žmogaus FSH receptoriumi, sekretavo padidintą progesterono kiekį, lyginant su kontrole (ta pati linija neapdorota FSH, netransfekuotos Y1 ląstelės bei Y1 ląstelės transfekuotos su CLH3AXSV2NEO α IVS). Viena neklonuota linija Y1HFSHR4-38 buvo parinkta hormono dozės atsako analizei. Naudojama procedūra buvo tokia pati, kaip aprašyta ankstesniame paragrafe, išskyrus tai, kad ląstelės buvo apdorotos FSH, kurio koncentracijos buvo nuo 0-100 mIU/ml. Kiekvienos dozės tyrimas buvo atliktas su pakartojimu. Progesterono kiekis, kurį produkavo FSH stimuliuotos Y1 ląstelės buvo normalizuotas iki 1×10^6 ląstelių ir nubraižytas priklausomybės nuo FSH koncentracijos grafikas, norint gauti atsako pagal dozę kreivę. Atsako pagal dozę kreivė parodyta Fig. 6. Šiame daliniame eksperimente 25 kartus išaugęs progesterono aktyvumas buvo stebimas esant 20mIU/ml žmogaus rekombinantinio FSH dozės. Ribos buvo nuo 2.5 iki 20mIU/ml ir ED₅₀ buvo 6.4mIU/ml FSH. Šie rezultatai, rodantys kad nuo FSH dozės priklauso progesterono sekrecijos išaugimas, buvo stebimi stabiliose Y1 ląstelėse transfekuotose žmogaus rekombinantiniu FSH receptoriumi. Žmogaus FSH receptorius yra funkciškai aktyvus, kai išskirtas pelių antinksčių Y1 ląstelėse.

Ląstelių populiacijos gautos iš CHO_HF_SHR4Q-13 arba Y1HFSHR4-38 ląstelių linijų, ar panašių ląstelių linijų, gali būti naudojamos FSH ar panašioms medžiagoms į FSH, biotyrimų in vitro jautrumo nustatymui. Kiti FSH in vitro tyrimai, kurie yra šiuo metu naudojami, tokie kaip granuliacinių ląstelių biotyrimai ir Sertoli ląstelių biotyrimai reikalauja žiurkių pirminės ląstelių kultūros padarymo kiekvieną kartą, kai tyrimai yra atliekami. Naujiems Y1 ląstelių ir CHO ląstelių biotyrimams yra naudojama stabilių transformuotų nepertraukiamų ląstelių linija. Tai įgalina biotyrimų in vitro metodų pranašumą praktikoje, lyginant su dabartiniais metodais, nes jie yra paprasti, tikslūs ir pastovūs.

Protokolas

SEKA ID Nr:1

Sekos charakteristikos

(A) Ilgis: 2179

(B) Tipas: nukleino rūgštis

(C) Grandiškumas: Dviguba

(D) Topologija: Linijinė

Molekulės tipas: kDNR - mRNR

Kilmės šaltinis:

(A) Organizmas: Homo sapiens

(F) Audinių tipas: Sėklidės

(A) Biblioteka: λgt11 kDNR biblioteka, Clon Tech #HL1010b

(B) Klonas: pHFSHR11-11, pHFSHR15-6

Savybė:

(A) Vardinis raktas: baltymą koduojantis regionas

(B) Lokacija: 75-2159

Sekos aprašymas: SEKA ID Nr:1

```

TGTGGAGCTT CTGAGATCTG TGGAGGTTTT TCTCTGCAAA TGCAGGAAGA AATCAGGTGG      60
ATGGATGCAT AATT ATG GCC CTG CTC CTG GTC TCT TTG CTG GCA TTC CTG      110
      Met Ala Leu Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Leu
      -15                               -10

AGC TTG GGC TCA GGA TGT CAT CAT CCG ATC TGT CAC TGC TCT AAC AGG      158
Ser Leu Gly Ser Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg
-5                               1                               5                               10

GTT TTT CTC TGC CAA GAG AGC AAG GTG ACA GAG ATT CCT TCT GAC CTC      206
Val Phe Leu Cys Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu
      15                               20                               25

CCG AGG AAT GCC ATT GAA CTG AGG TTT GTC CTC ACC AAG CTT CGA GTC      254

```

Pro	Arg	Asn	Ala	Ile	Glu	Leu	Arg	Phe	Val	Leu	Thr	Lys	Leu	Arg	Val	
		30					35					40				
ATC	CAA	AAA	GGT	GCA	TTT	TCA	GGA	TTT	GGG	GAC	CTG	GAG	AAA	ATA	GAG	302
Ile	Gln	Lys	Gly	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Gly	Asp	Leu	Glu	Lys	Ile	Glu	
	45					50					55					
ATC	TCT	CAG	AAT	GAT	GTC	TTG	GAG	GTG	ATA	GAG	GCA	GAT	GTG	TTC	TCC	350
Ile	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Leu	Glu	Val	Ile	Glu	Ala	Asp	Val	Phe	Ser	
60					65					70					75	
AAC	CTT	CCC	AAA	TTA	CAT	GAA	ATT	AGA	ATT	GAA	AAG	GCC	AAC	AAC	CTG	398
Asn	Leu	Pro	Lys	Leu	His	Glu	Ile	Arg	Ile	Glu	Lys	Ala	Asn	Asn	Leu	
				80					85					90		
CTC	TAC	ATC	AAC	CCT	GAG	GCC	TTC	CAG	AAC	CTT	CCC	ACC	CTT	CAA	TAT	446
Leu	Tyr	Ile	Asn	Pro	Glu	Ala	Phe	Gln	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Gln	Tyr	
			95					100					105			
CTG	TTA	ATA	TCC	AAC	ACA	GGT	ATT	AAG	CAC	CTT	CCA	GAT	GTT	CAC	AAG	494
Leu	Leu	Ile	Ser	Asn	Thr	Gly	Ile	Lys	His	Leu	Pro	Asp	Val	His	Lys	
		110					115					120				
ATT	CAT	TCT	CTC	CAA	AAA	GTT	TTA	CTT	GAC	ATT	CAA	GAT	AAC	ATA	AAC	542
Ile	His	Ser	Leu	Gln	Lys	Val	Leu	Leu	Asp	Ile	Gln	Asp	Asn	Ile	Asn	
	125					130					135					
ATC	CAC	ACA	ATT	GAA	AGA	AAT	TCT	TTC	GTG	GGG	CTG	AGC	TTT	GAA	AGT	590
Ile	His	Thr	Ile	Glu	Arg	Asn	Ser	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Phe	Glu	Ser	
140					145					150					155	
GTG	ATT	CTA	TGG	CTG	AAT	AAG	AAT	GGG	ATT	CAA	GAA	ATA	CAC	AAC	TGT	638
Val	Ile	Leu	Trp	Leu	Asn	Lys	Asn	Gly	Ile	Gln	Glu	Ile	His	Asn	Cys	
				160					165					170		
GCA	TTC	AAT	GGA	ACC	CAA	CTA	GAT	GAG	CTG	AAT	CTA	AGC	GAT	AAT	AAT	686
Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Gln	Leu	Asp	Glu	Leu	Asn	Leu	Ser	Asp	Asn	Asn	
			175					180					185			
AAT	TTA	GAA	GAA	TTG	CCT	AAT	GAT	GTT	TTC	CAC	GGA	GCC	TCT	GGA	CCA	734
Asn	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro	Asn	Asp	Val	Phe	His	Gly	Ala	Ser	Gly	Pro	
		190					195					200				
GTC	ATT	CTA	GAT	ATT	TCA	AGA	ACA	AGG	ATC	CAT	TCC	CTG	CCT	AGC	TAT	782
Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr	Arg	Ile	His	Ser	Leu	Pro	Ser	Tyr	
	205					210					215					
GGC	TTA	GAA	AAT	CTT	AAG	AAG	CTG	AGG	GCC	AGG	TCG	ACT	TAC	AAC	TTA	830
Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Asn	Leu	
220					225					230					235	
AAA	AAG	CTG	CCT	ACT	CTG	GAA	AAG	CTT	GTC	GCC	CTC	ATG	GAA	GCC	AGC	878
Lys	Lys	Leu	Pro	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Glu	Ala	Ser	
				240					245					250		
CTC	ACC	TAT	CCC	AGC	CAT	TGC	TGT	GCC	TTT	GCA	AAC	TGG	AGA	CGG	CAA	926

Leu	Thr	Tyr	Pro	Ser	His	Cys	Cys	Ala	Phe	Ala	Asn	Trp	Arg	Arg	Gln	
			255					260					265			
ATC	TCT	GAG	CTT	CAT	CCA	ATT	TGC	AAC	AAA	TCT	ATT	TTA	AGG	CAA	GAA	974
Ile	Ser	Glu	Leu	His	Pro	Ile	Cys	Asn	Lys	Ser	Ile	Leu	Arg	Gln	Glu	
		270					275				280					
GTT	GAT	TAT	ATG	ACT	CAG	ACT	AGG	GGT	CAG	AGA	TCC	TCT	CTG	GCA	GAA	1022
Val	Asp	Tyr	Met	Thr	Gln	Thr	Arg	Gly	Gln	Arg	Ser	Ser	Leu	Ala	Glu	
	285					290					295					
GAC	AAT	GAG	TCC	AGC	TAC	AGC	AGA	GGA	TTT	GAC	ATG	ACG	TAC	ACT	GAG	1070
Asp	Asn	Glu	Ser	Ser	Tyr	Ser	Arg	Gly	Phe	Asp	Met	Thr	Tyr	Thr	Glu	
300					305					310					315	
TTT	GAC	TAT	GAC	TTA	TGC	AAT	GAA	GTG	GTT	GAC	GTG	ACC	TGC	TCC	CCT	1118
Phe	Asp	Tyr	Asp	Leu	Cys	Asn	Glu	Val	Val	Asp	Val	Thr	Cys	Ser	Pro	
				320					325					330		
AAG	CCA	GAT	GCA	TTC	AAC	CCA	TGT	GAA	GAT	ATC	ATG	GGG	TAC	AAC	ATC	1166
Lys	Pro	Asp	Ala	Phe	Asn	Pro	Cys	Glu	Asp	Ile	Met	Gly	Tyr	Asn	Ile	
			335					340					345			
CTC	AGA	GTC	CTG	ATA	TGG	TTT	ATC	AGC	ATC	CTG	GCC	ATC	ACT	GGG	AAC	1214
Leu	Arg	Val	Leu	Ile	Trp	Phe	Ile	Ser	Ile	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	
		350					355					360				
ATC	ATA	GTG	CTA	GTG	ATC	CTA	ACT	ACC	AGC	CAA	TAT	AAA	CTC	ACA	GTC	1262
Ile	Ile	Val	Leu	Val	Ile	Leu	Thr	Thr	Ser	Gln	Tyr	Lys	Leu	Thr	Val	
	365					370					375					
CCC	AGG	TTC	CTT	ATG	TGC	AAC	CTG	GCC	TTT	GCT	GAT	CTC	TGC	ATT	GGA	1310
Pro	Arg	Phe	Leu	Met	Cys	Asn	Leu	Ala	Phe	Ala	Asp	Leu	Cys	Ile	Gly	
380					385					390					395	
ATC	TAC	CTG	CTG	CTC	ATT	GCA	TCA	GTT	GAT	ATC	CAT	ACC	AAG	AGC	CAA	1358
Ile	Tyr	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Ile	His	Thr	Lys	Ser	Gln	
				400					405				410			
TAT	CAC	AAC	TAT	GCC	ATT	GAC	TGG	CAA	ACT	GGG	GCA	GGC	TGT	GAT	GCT	1406
Tyr	His	Asn	Tyr	Ala	Ile	Asp	Trp	Gln	Thr	Gly	Ala	Gly	Cys	Asp	Ala	
			415					420					425			
GCT	GGC	TTT	TTC	ACT	GTC	TTT	GCC	AGT	GAG	CTG	TCA	GTC	TAC	ACT	CTG	1454
Ala	Gly	Phe	Phe	Thr	Val	Phe	Ala	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Tyr	Thr	Leu	
		430					435					440				
ACA	GCT	ATC	ACC	TTG	GAA	AGA	TGG	CAT	ACC	ATC	ACG	CAT	GCC	ATG	CAG	1502
Thr	Ala	Ile	Thr	Leu	Glu	Arg	Trp	His	Thr	Ile	Thr	His	Ala	Met	Gln	
	445					450					455					
CTG	GAC	TGC	AAG	GTG	CAG	CTC	CGC	CAT	GCT	GCC	AGT	GTC	ATG	GTG	ATG	1550
Leu	Asp	Cys	Lys	Val	Gln	Leu	Arg	His	Ala	Ala	Ser	Val	Met	Val	Met	
460					465					470					475	
GGC	TGG	ATT	TTT	GCT	TTT	GCA	GCT	GCC	CTC	TTT	CCC	ATC	TTT	GGC	ATC	1598

Gly	Trp	Ile	Phe	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Pro	Ile	Phe	Gly	Ile	
				480					485					490		
AGC	AGC	TAC	ATG	AAG	GTG	AGC	ATC	TGC	CTG	CCC	ATG	GAT	ATT	GAC	AGC	1646
Ser	Ser	Tyr	Met	Lys	Val	Ser	Ile	Cys	Leu	Pro	Met	Asp	Ile	Asp	Ser	
			495					500					505			
CCT	TTG	TCA	CAG	CTG	TAT	GTC	ATG	TCC	CTC	CTT	GTG	CTC	AAT	GTC	CTG	1694
Pro	Leu	Ser	Gln	Leu	Tyr	Val	Met	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	Asn	Val	Leu	
		510					515					520				
GCC	TTT	GTG	GTC	ATC	TGT	GGC	TGC	TAT	ATC	CAC	ATC	TAC	CTC	ACA	GTG	1742
Ala	Phe	Val	Val	Ile	Cys	Gly	Cys	Tyr	Ile	His	Ile	Tyr	Leu	Thr	Val	
	525					530					535					
CGG	AAC	CCC	AAC	ATC	GTG	TCC	TCC	TCT	AGT	GAC	ACC	AGG	ATC	GCC	AAG	1790
Arg	Asn	Pro	Asn	Ile	Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Asp	Thr	Arg	Ile	Ala	Lys	
540					545					550					555	
CGC	ATG	GCC	ATG	CTC	ATC	TTC	ACT	GAC	TTC	CTC	TGC	ATG	GCA	CCC	ATT	1838
Arg	Met	Ala	Met	Leu	Ile	Phe	Thr	Asp	Phe	Leu	Cys	Met	Ala	Pro	Ile	
				560					565					570		
TCT	TTC	TTT	GCC	ATT	TCT	GCC	TCC	CTC	AAG	GTG	CCC	CTC	ATC	ACT	GTG	1886
Ser	Phe	Phe	Ala	Ile	Ser	Ala	Ser	Leu	Lys	Val	Pro	Leu	Ile	Thr	Val	
			575					580					585			
TCC	AAA	GCA	AAG	ATT	CTG	CTG	GTT	CTG	TTT	CAC	CCC	ATC	AAC	TCC	TGT	1934
Ser	Lys	Ala	Lys	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	His	Pro	Ile	Asn	Ser	Cys	
		590					595					600				
GCC	AAC	CCC	TTC	CTC	TAT	GCC	ATC	TTT	ACC	AAA	AAC	TTT	CGC	AGA	GAT	1982
Ala	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ala	Ile	Phe	Thr	Lys	Asn	Phe	Arg	Arg	Asp	
	605					610					615					
TTC	TTC	ATT	CTG	CTG	AGC	AAG	TGT	GGC	TGC	TAT	GAA	ATG	CAA	GCC	CAA	2030
Phe	Phe	Ile	Leu	Leu	Ser	Lys	Cys	Gly	Cys	Tyr	Glu	Met	Gln	Ala	Gln	
620					625					630					635	
ATT	TAT	AGG	ACA	GAA	ACT	TCA	TCC	ACT	GTC	CAC	AAC	ACC	CAT	CCA	AGG	2078
Ile	Tyr	Arg	Thr	Glu	Thr	Ser	Ser	Thr	Val	His	Asn	Thr	His	Pro	Arg	
				640					645					650		
AAT	GGC	CAC	TGC	TCT	TCA	GCT	CCC	AGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC	2126
Asn	Gly	His	Cys	Ser	Ser	Ala	Pro	Arg	Val	Thr	Asn	Gly	Ser	Thr	Tyr	
			655					660					665			
ATA	CTT	GTC	CCT	CTA	AGT	CAT	TTA	GCC	CAA	AAC	TAAAACACAA	TGTGAAAATG				2179
Ile	Leu	Val	Pro	Leu	Ser	His	Leu	Ala	Gln	Asn						
		670					675									

Savybė:

(A) Vardinis raktas: transmembraninis domenas

(B) Lokacija: 350-613

(C) Indentifikacinis metodas: panašumas į kitus G baltymus surišančius receptoriaus transmembraninius domenų

Savybė:

(A) Vardinis raktas: tikėtinai transmembraninis domenas I

(B) Lokacija: 350-370

(C) Indentifikacinis metodas: panašumas į kitus G baltymus surišančius receptoriaus transmembraninius domenų, hidrofobiškas, apie 20-23 amino rūgščių ilgio

Savybė:

(A) Vardinis raktas: tikėtinai transmembraninis domenas II

(B) Lokacija: 382-404

(C) Indentifikacinis metodas: panašumas į kitus G baltymus surišančius receptoriaus transmembraninius domenų, hidrofobiškas, apie 20-23 amino rūgščių ilgio

Savybė:

(A) Vardinis raktas: tikėtinai transmembraninis domenas III

(B) Lokacija: 427-448

(C) Indentifikacinis metodas: panašumas į kitus G baltymus surišančius receptoriaus transmembraninius domenų, hidrofobiškas, apie 20-23 amino rūgščių ilgio

Savybė:

(A) Vardinis raktas: tikėtinai transmembraninis domenas IV

(B) Lokacija: 469-491

(C) Indentifikacinis metodas: panašumas į kitus G baltymus surišančius receptoriaus transmembraninius domenų, hidrofobiškas, apie 20-23 amino rūgščių ilgio

Savybė:

(A) Vardinis raktas: tikėtinai transmembraninis domenas V

(B) Lokacija: 512-533

(C) Indentifikacinis metodas: panašumas į kitus G baltymus surišančius receptoriaus transmembraninius domenų, hidrofobiškas, apie 20-23 amino rūgščių ilgio

Savybė:

(A) Vardinis raktas: tikėtinai transmembraninis domenas VI

(B) Lokacija: 557-580

(C) Indentifikacinis metodas: panašumas į kitus G baltymus surišančius receptoriaus transmembraninius domenų, hidrofobiškas, apie 20-23 amino rūgščių ilgio

Savybė:

(A) Vardinis raktas: tikėtinai transmembraninis domenas VII

(B) Lokacija: 592-613

(C) Indentifikacinis metodas: panašumas į kitus G baltymus surišančius receptoriaus transmembraninius domenų, hidrofobiškas, apie 20-23 amino rūgščių ilgio

Savybė:

(A) Vardinis raktas: tikėtinai C galo viduląstelinis domenas

(B) Lokacija: 614-678

Sekos aprašymas: SEKA ID Nr.2:

Met Ala Leu Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Leu Ser Leu Gly Ser
-15 -10 -5

Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg Val Phe Leu Cys
1 5 10 15

Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu Pro Arg Asn Ala
 20 25 30
 Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val Ile Gln Lys Gly
 35 40 45
 Ala Phe Ser Gly Phe Gly Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ile Ser Gln Asn
 50 55 60
 Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser Asn Leu Pro Lys
 65 70 75
 Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu Leu Tyr Ile Asn
 80 85 90 95
 Pro Glu Ala Phe Gln Asn Leu Pro Asn Leu Gln Tyr Leu Leu Ile Ser
 100 105 110
 Asn Thr Gly Ile Lys His Leu Pro Asp Val His Lys Ile His Ser Leu
 115 120 125
 Gln Lys Val Leu Leu Asp Ile Gln Asp Asn Ile Asn Ile His Thr Ile
 130 135 140
 Glu Arg Asn Ser Phe Val Gly Leu Ser Phe Glu Ser Val Ile Leu Trp
 145 150 155
 Leu Asn Lys Asn Gly Ile Gln Glu Ile His Asn Cys Ala Phe Asn Gly
 160 165 170 175
 Thr Gln Leu Asp Glu Leu Asn Leu Ser Asp Asn Asn Asn Leu Glu Glu
 180 185 190
 Leu Pro Asn Asp Val Phe His Gly Ala Ser Gly Pro Val Ile Leu Asp
 195 200 205
 Ile Ser Arg Thr Arg Ile His Ser Leu Pro Ser Tyr Gly Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Lys Lys Leu Arg Ala Arg Ser Thr Tyr Asn Leu Lys Lys Leu Pro
 225 230 235
 Thr Leu Glu Lys Leu Val Ala Leu Met Glu Ala Ser Leu Thr Tyr Pro
 240 245 250 255
 Ser His Cys Cys Ala Phe Ala Asn Trp Arg Arg Gln Ile Ser Glu Leu
 260 265 270
 His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Glu Val Asp Tyr Met
 275 280 285
 Thr Gln Thr Arg Gly Gln Arg Ser Ser Leu Ala Glu Asp Asn Glu Ser
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Arg Gly Phe Asp Met Thr Tyr Thr Glu Phe Asp Tyr Asp

305		310		315
Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro Lys Pro Asp Ala				
320		325		330 335
Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile Leu Arg Val Leu				
	340		345	350
Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn Ile Ile Val Leu				
	355		360	365
Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe Leu				
	370		375	380
Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly Ile Tyr Leu Leu				
	385		390 395	
Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln Tyr His Asn Tyr				
400		405		410 415
Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala Ala Gly Phe Phe				
	420		425	430
Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Ala Ile Thr				
	435		440	445
Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln Leu Asp Cys Lys				
	450		455	460
Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met Gly Trp Ile Phe				
	465		470	475
Ala Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile Ser Ser Tyr Met				
480		485		490 495
Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gln				
	500		505	510
Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu Ala Phe Val Val				
	515		520	525
Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val Arg Asn Pro Asn				
	530		535	540
Ile Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Arg Ile Ala Lys Arg Met Ala Met				
	545		550	555
Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile Ser Phe Phe Ala				
560		565		570 575
Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Ser Lys Ala Lys				
	580		585	590
Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe				
	595		600	605

Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp Phe Phe Ile Leu
610 615 620

Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln Ile Tyr Arg Thr
625 630 635

Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg Asn Gly His Cys
640 645 650 655

Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Ile Leu Val Pro
660 665 670

Leu Ser His Leu Ala Gln Asn
675

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Išgrynintas žmogaus folikulą stimuliuojančio hormono (FSH) receptorius, jo fragmentas ar mutantas, kuris susiriša su FSH.

2. FSH receptorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi aminorūgščių seką nuo 1 iki 678, parodytą ID Nr:2, o seka ID Nr2 yra šios apibrėžties dalis.

3. FSH receptorius pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad FSH receptoriaus citoplazminis domenas yra pašalintas.

4. FSH receptorius pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad FSH receptoriaus transmembraninis domenas yra pašalintas.

5. FSH receptorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad FSH receptorius turi aminorūgščių seką nuo 1 iki 678, parodytą sekoje ID Nr:2, ar jos esminę dalį su iš esmės tokiomis pačiomis FSH surišančiomis savybėmis, o seka ID Nr.2. yra šios apibrėžties dalis.

6. Išskirta DNR, koduojanti žmogaus FSH receptorių, jo fragmentą ar mutantą, surišantį FSH.

7. Išskirta DNR pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad išskirta DNR turi nukleotidų seką, atvaizduotą sekoje ID Nr.1, o seka ID Nr.1 yra šios apibrėžties dalis.

8. DNR seka pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad išskirtos DNR nukleotidų seka, koduojanti FSH receptoriaus citoplazminį domeną, yra pašalinta.

9. DNR seka pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad išskirtos DNR nukleotidų seka, koduojanti FSH receptoriaus transmembraninį domeną, yra pašalinta.

10. Išskirta DNR pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos nukleotidų seka, koduoja aminorūgščių seką nuo 1 iki 349, parodytą sekoje ID Nr.2, ar jos

esminę dalį su iš esmės tokiomis pačiomis FSH surišančiomis savybėmis, o seka ID Nr.2 yra šios apibrėžties dalis.

11. Rekombinantinis ekspresijos vektorius, apimantis DNR pagal 6, 7, 8, 9 ir 10 punktus.

12. Ląstelės, b e s i s k i r i a n č i o s tuo, kad yra transfekuotos ekspresijos vektoriumi pagal 11 punktą.

13. Ląstelės pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n č i o s tuo, kad yra žinduolių ląstelės.

14. Žmogaus FSH receptoriaus, jo fragmento ar mutanto, kurie suriša FSH, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima ląstelių pagal 12 punktą kultivavimą mitybinėje terpėje it receptoriaus išgavimą.

15. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ląstelės yra žinduolių ląstelės.

16. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima žmogaus FSH receptorių, jo fragmentą ar mutantą, kurie suriša FSH, bei farmakologiškai priimtina nešiklį.

17. Kompozicija pagal 16 punktą, turinti žmogaus FSH fragmentą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas fragmentas apima žmogaus FSH receptoriaus N-galo ekstraląstelinį domeną ar jo esminę dalį su iš esmės tokiomis pačiomis FSH surišančiomis savybėmis.

18. Žmogaus FSH nustatymo, naudojant FSH receptorių, pagerintas būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas FSH receptorių yra išgrynintas žmogaus FSH receptorių, jo fragmentas ar mutantas, surišantis FSH.

19. Būdas pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra naudojamas žmogaus FSH receptoriaus fragmentas, ir šis fragmentas apima žmogaus FSH receptoriaus N-galo ekstraląstelinį domeną ar jo esminę dalį su iš esmės tokiomis pačiomis FSH surišančiomis savybėmis.

20. Išgrynintas žmogaus FSH receptorių, jo fragmentas ar mutantas, skirtas endogeninio FSH bioaktyvumo paciento organizme sumažinimui.

21. Išgryninto žmogaus FSH receptoriaus, jo fragmento ar mutanto, surišančių FSH, panaudojimas medikamentų, skirtų folikulo augimo ir subrendimo moters organizme sustabdymui, gamyboje.

22. Išgryninto žmogaus FSH receptoriaus, jo fragmento ar mutanto, surišančių FSH, panaudojimas medikamentų, skirtų spermatogenezės vyro organizme sutrukdymui, gamyboje.

23. Panaudojimas pagal 21 ir 22 punktą, b e s i s k i r i á n t i s tuo, kad kaip FSH receptoriaus fragmentą minėtų medikamentų gamyboje naudoja žmogaus FSH receptoriaus N-galo ekstraląstelinį domeną ar jo esminę dalį su iš esmės tokiais pačiomis FSH surišančiomis savybėmis.

24. Substancijų, turinčių FSH bioaktyvumą, pavyzdžio tyrimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad įjungia rekombinantinių ląstelių linijos, esant minėtam pavyzdžiui, kultivavimą, kai minėta rekombinantinių ląstelių linija yra pritaikyta išskirti žmogaus FSH receptorių bei produkuoti nustatomą biologinį atsaką, esant FSH, o taip pat apima bet kokio biologinio atsako išmatavimą.

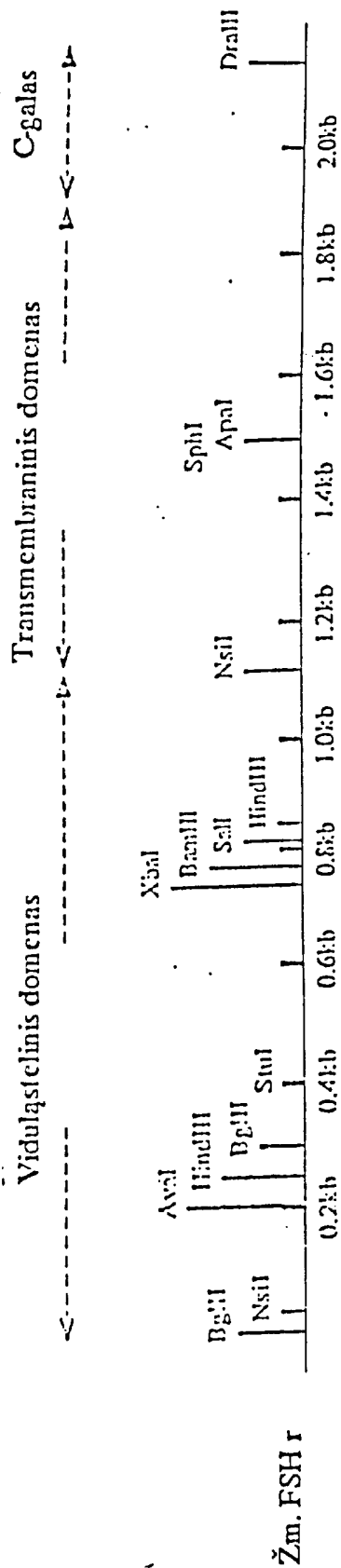


Fig. 1

KDNR-Klonai :

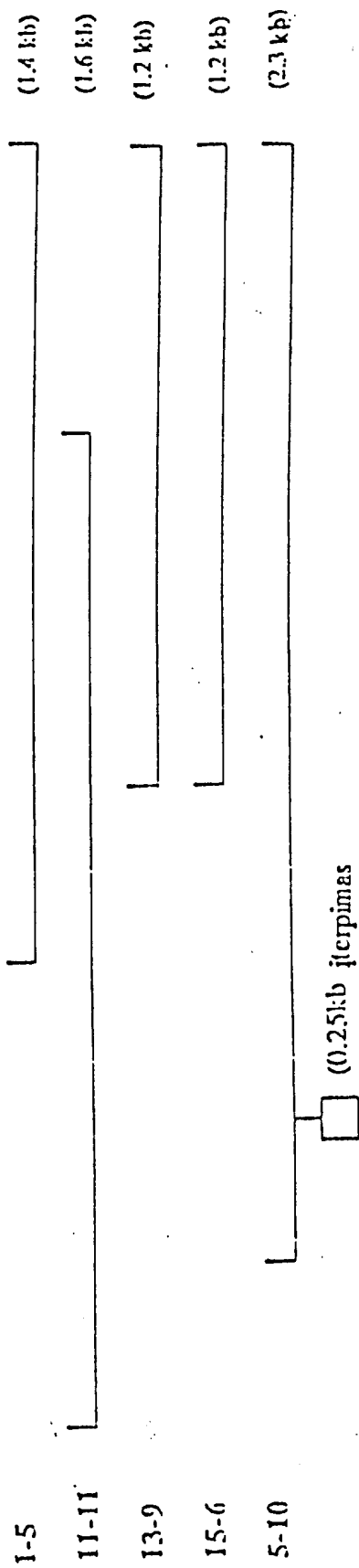


Fig. 2

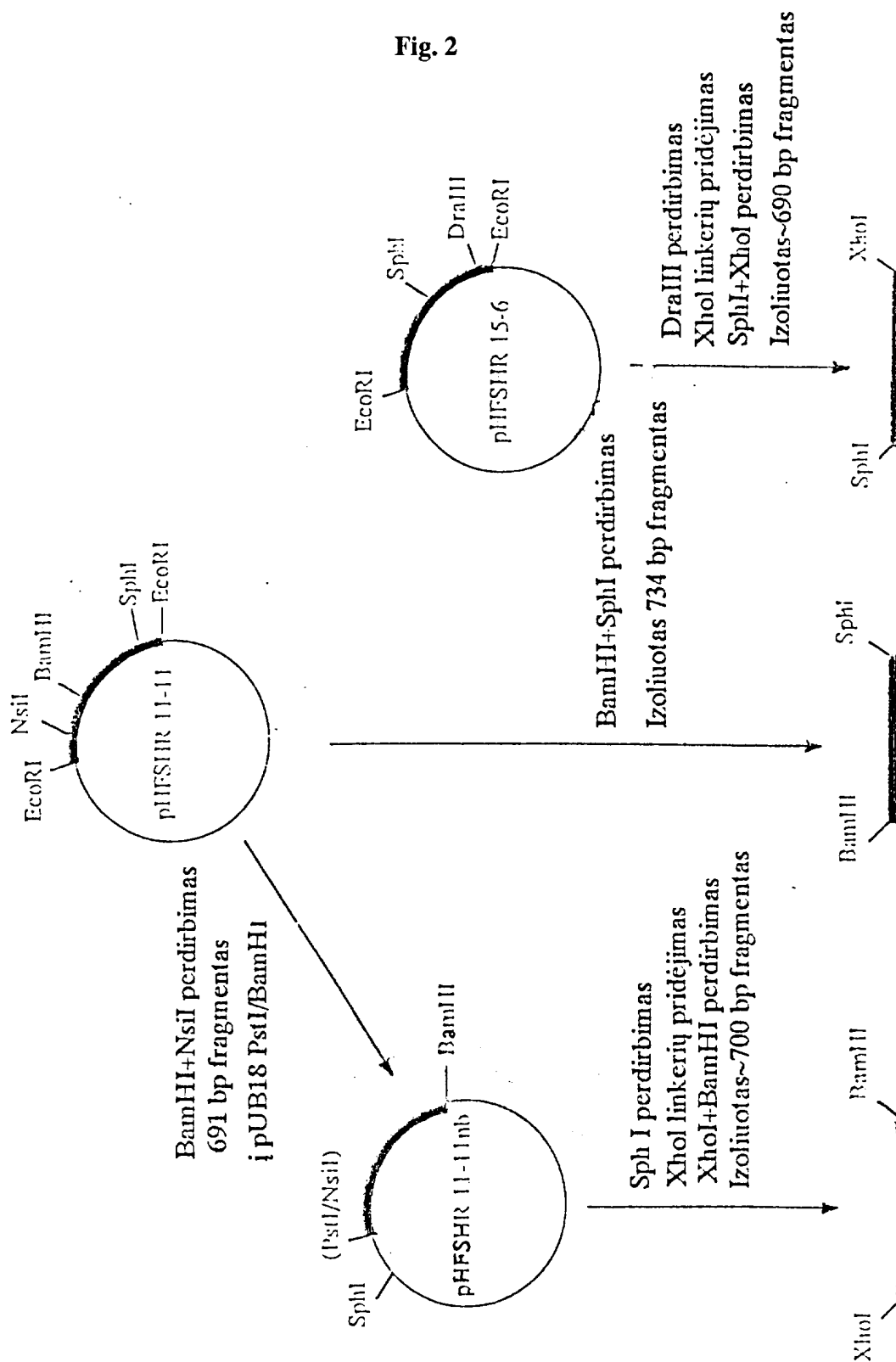


Fig. 2B

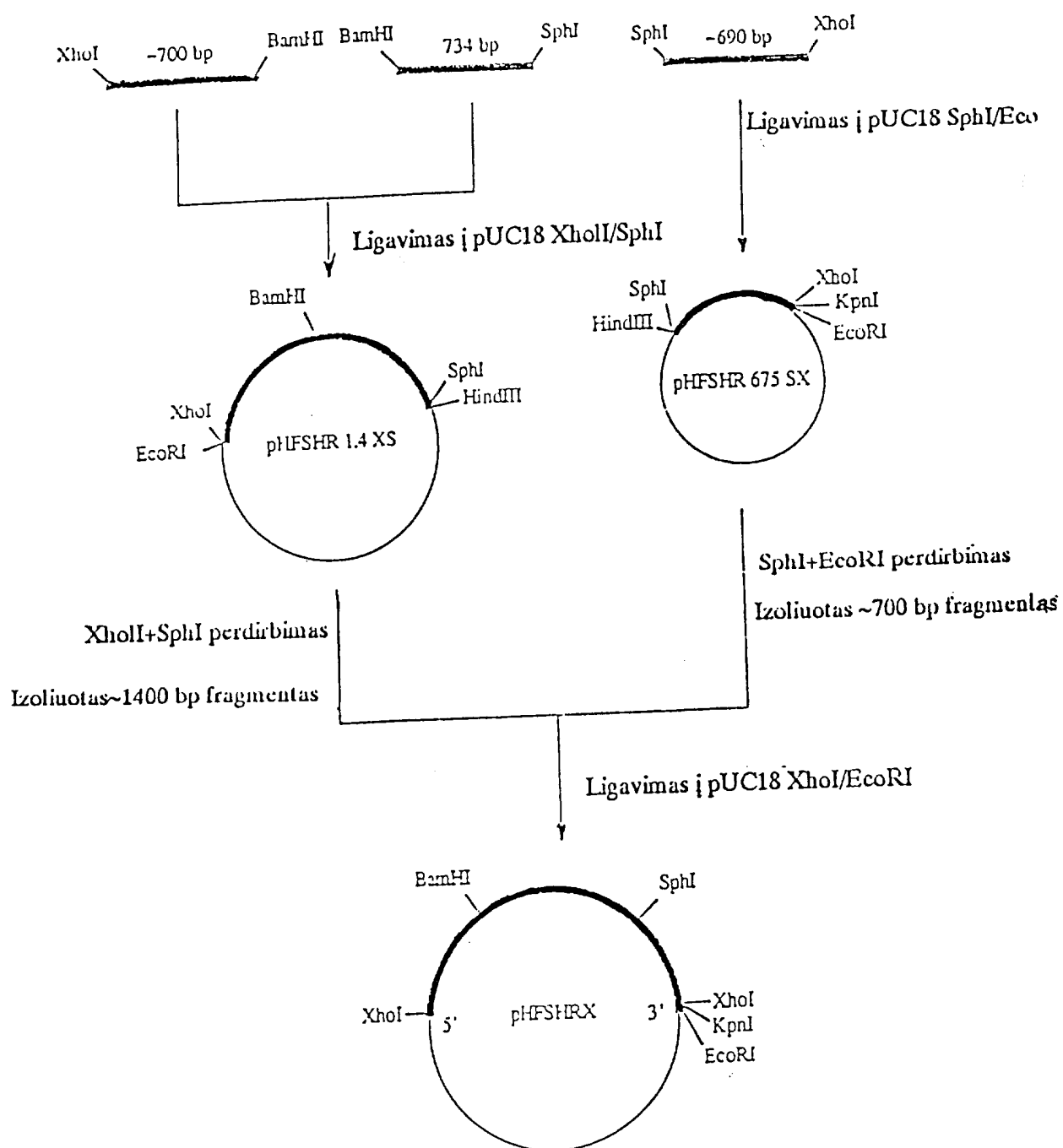


Fig. 3

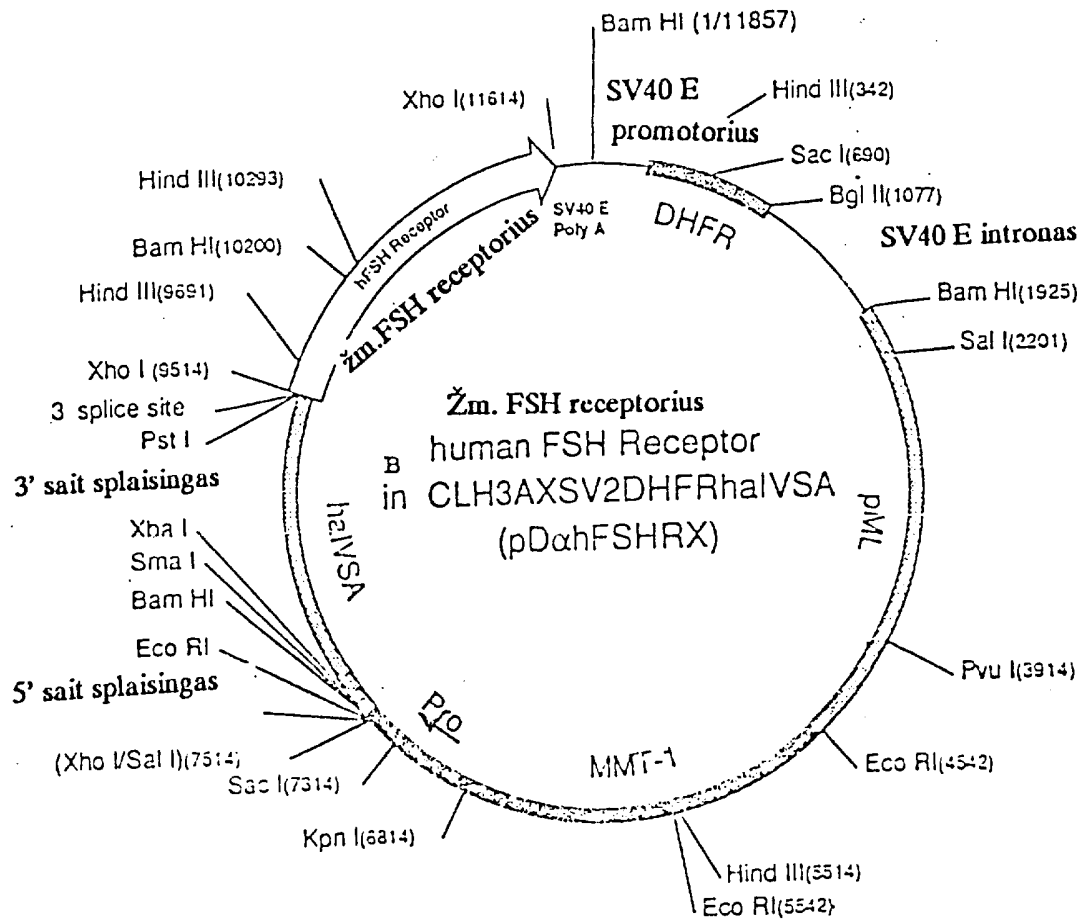


Fig. 4

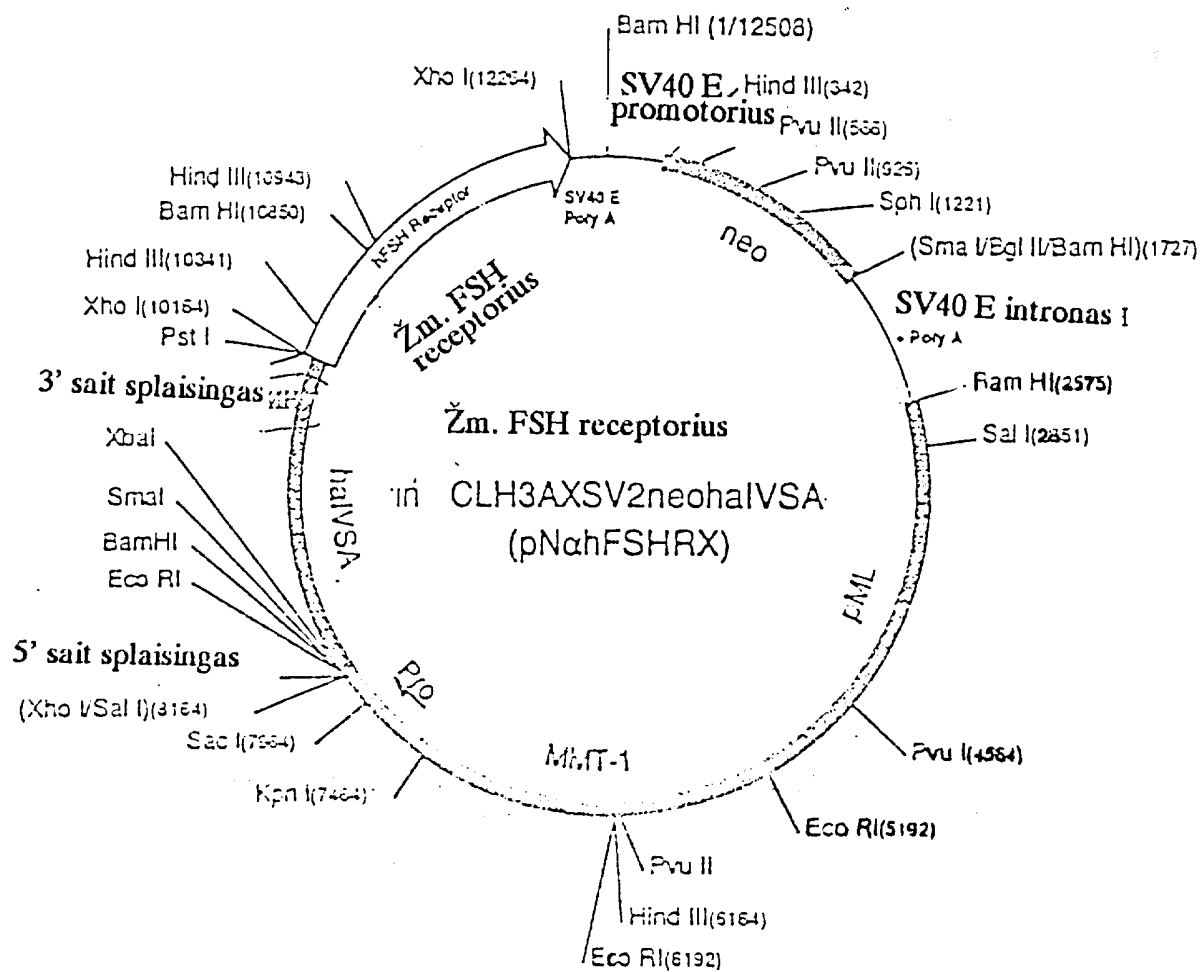


Fig. 5

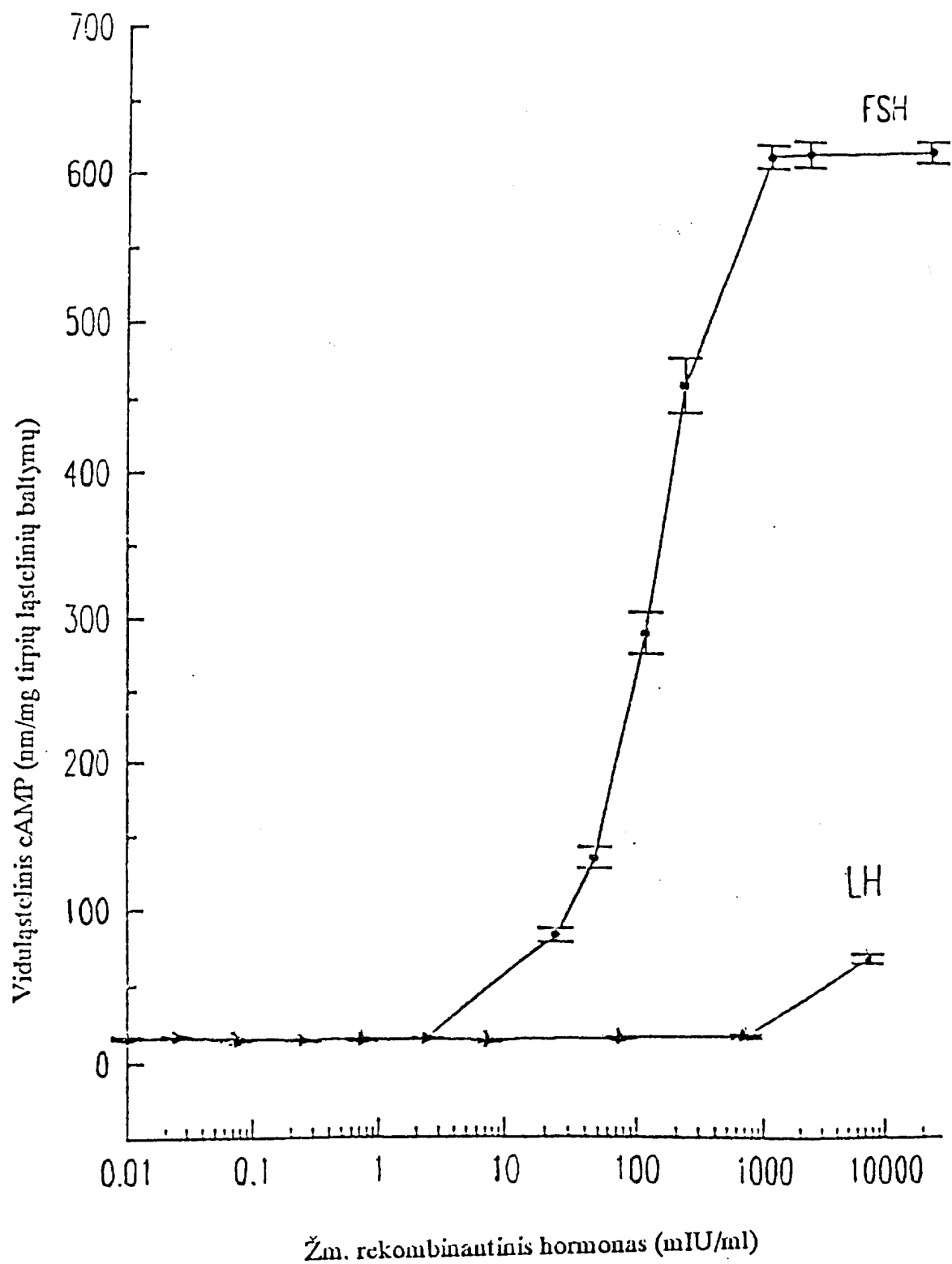


Fig. 6

