

-
- (11) Patent numeris: **3998** (51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/67**
C12N 15/11
- (21) Paraiškos numeris: **IP1595** **C12N 1/11**
C12N 5/10
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 15**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **1996 06 25**
- (60) SU duomenys: **PCT/US 90/07642, 1990 12 21**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **454783, 1989 12 22, US**
- (72) Išradėjas:
Scott C. Chappel, 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
-

- (54) Pavadinimas:
Endogeninių genų ekspresijos modifikacija reguliuojančiu elementu

- (57) Referatas:

Normaliai transkriptiškai ląstelių linijoje ar mikroorganizme tylus genas gali būti aktyvuojamas ekspresijai, įterpiant DNR reguliacinį elementą, kuris sugeba inicijuoti normalią geno produkto ekspresiją šiose ląstelėse arba jis gali būti įvairiarūšis, reguliacinis elementas įterptas taip, kad būtų operatyviai sujungtas su normaliai tyliu genu, jei to reikalaujama. Įterpimas atliekamas homologinės rekombinacijos pagalba, sukuriant DNR konstrukciją, turinčią savyje normaliai tylinčio geno DNR segmentą (taikinio DNR) ir DNR reguliacinį elementą, indukuojantį transkripciją. Šis metodas taip pat naudojamas bet kokių endogeninių genų, ląstelių linijose ar mikroorganizmuose, ekspresijos charakteristikų modifikavimui.

Šis išradimas surištas su procesu, kurio pagalba modifikuojamos geno, kuris natūraliai yra genome stabilių ląstelių linijoje ar klonuotame mikroorganizme, ekspresijos charakteristikos. Šis išradimas surištas su geno, kuris yra stabilių ląstelių linijoje ir normaliai netranskribuojamas arba inertiškas, aktyvacijos ir ekspresijos procesu. Rezultate - šio geno koduojamas baltymas yra ekspresuojamas. Šis reiškinys pasireiškia be ląstelių transfektingo su DNR, kuri koduoja produktą. Greičiausia, rezidentinis genas, kuoduojantis norimą produktą, identifikuojamas ląstelėje ir aktyvuojamas įterpiant tinkamą reguliatorinį segmentą, panaudojant metodą, kuris vadinamas homologine rekombinacija. Teigiami ir (arba) neigiami pasirinkti markeriai taip pat gali būti įterpti tam, kad padėtų atrinkti ląsteles, kuriose teisinga homologinė rekombinacija įvyko. Papildomai išradime pasirinktas genas gali būti amplifikuotas tam, kad padidintų ekspresijos greičius, nežiūrint kad genas yra normaliai netranskribuojamas ir gali būti aktyvuotas pagal šį išradimą arba kaip endogeniškai ekspresuojamas produktas.

Gera žinoma, kad kiekviena ląstelė organizme turi genetinę informaciją, kuri koduoja visus baltymus, randamus organizme. Bet, labai nedidelis genų, esančių duotajame ląstelės tipe, procentas yra transkribuojamas. Viduląstelinis mechanizmas, kuriuo reguliuojamas transkribuojamų genų masyvas, yra jau suprastas. Specifiniai ląstelių baltymai, kurie yra branduojyje, sąveikauja su DNR reguliatoriniais segmentais, kurie yra susieti su tam tikrais genais. Ši sąveika branduolio baltymų su DNR reguliatorinėmis sekomis yra reikalinga genų transkripcijai. Rezultate vyksta iRNA biosintezė ir koduojamų genų ekspresija (Mitchell and Tjian, Science, 245:371, 1989).

Šie DNR reguliatoriniai segmentai arba elementai kiekviename gene yra 5'-krypties, ir atskirais atvejais, viduje arba net 3'-krypties. Dėka sąveikos su ląstelės specifiniais branduolio baltymais DNR reguliaciniai segmentai įtakoja RNR polimerazės, ekspresijos greitį limituojančio fermento aktyvumui, legvina priėjimo prie geno ir iRNR sintezę. Taigi, šie DNR segmentai ir rezidentiniai branduoliniai baltymai turi esminę reikšmę specifinių genų ekspresijos reguliacijai (Johnson and McKnight, Ann. Rev. Biochem., 58:799, 1989).

DNR reguliatoriniai segmentai yra surišimo su branduolio baltymais sritis. Šie branduolio baltymai jungiasi su DNR spirale ir, matyt, pakeičia jos struktūrą taip, kad reikalingą geną atpažįsta RNR polimerazė ir tai palengvina geno transkripciją. Šių specifinių reguliacinių baltymų ekspresija ląstelėse apsprendžia, kuris genas bus transkribuojamas ląstelės viduje ir greitį kuriuo ši ekspresija vyktų.

Šios specifinės sistemos pavyzdys: hipofizio ląstelės, bet ne kepenų ląstelės, ekspresuoja hipofizio baltymus, nepaisant to, kad, hipofizio genai, yra visose kepenų ląstelėse. Kepenų ląstelių branduoliai neturi specifinių DNR baltymų, kurie sąveikauja su hipofizio rezidentiniais genais kepenų ląstelėse.

Dabartiniai baltymų ekspresijos metodai, panaudojant rekombinantinės DNR technologiją.

Žinodami, kad specifinės DNR reguliatorinės sekos yra reikalingos aktyvuoti geno transkripciją tam tikrame ląstelės tipe, mokslininkai ekspresavo svetimus genus, naudojant genetinę inžineriją. Pagrindė, DNR reguliaciniai segmentai, kurie yra atpažįstami ląstelės branduolio baltymų, yra 5' krypties ekspresuojamam svetimo geno koduojamam regionui. Šiuo būdu po insercijos į ląstelę, svetimą DNR gali būti ekspresuojama, kadangi ląstelės branduolio reguliatoriniai baltymai dabar atpažįsta šias reguliacines sekas. Šis metodas buvo naudojamas baltymų gavimui, kuriuos buvo sunku gauti ir išvalyti iš gamtinių šaltinių tradiciniais baltymų valymo būdais.

Šalia atpažįstamų DNR sekų ir dominančio geno yra naudojamas markeris prijungiamas prie DNR konstrukcijos. Šiuo būdu atrenkamos tiksliai tos ląstelės, kurios išgyvena selekcijos terpėje. Pavyzdžiui, neomicinui atsparus genas gali būti įterptas į ekspresijos vektorius. Po transfekcijos ląstelės auginamos G418 terpėje, kurioje esantis neomicinas yra letalus žinduolių ląstelėms. Ląstelės, turinčios reikalingą atsparumo neomicinui geną, bus atsparios šiam toksiškam poveikiui. Tokiu būdu, tik ląstelės, turinčios transfekuotą DNR, išlieka kultūroje. Suprantama, kad bet koks markeris gali būti naudojamas pakankamai ilgai ląstelių, turinčių transfekuotą DNR, selekcijai. Taip pat suprantama, kad papildoma genetinė informacija gali būti bet kur ląstelėje. Bet svarbu, kad abu -regulatorinis segmentas ir svetimas genas (taip pat ir markeris jame) būtų įvesti kartu.

Dabartinių genų ekspresijos metodų trūkumai

Nors aukščiau aprašyti metodai suteikia didesnes galimybes genų inžinerijai, jie ne visada būna efektyvūs genų ekspresijai. Tai surišta su tuo faktu, kad įterpimas DNR į ląstelės linijos branduolį paprastai pasiekiamas transfekcijos metodu. Išskiriama dominanti DNR, kuri įvedama į ląstelę, tam kad ji būtų ekspresuota, ištirpinant ląstelės membraną, kad būtų prieinama DNR. Kaip pažymėta aukščiau, tiksli vieta, į kurią įjungiamas DNR į genomą niekada nenusakoma; iš tikrųjų DNR gali išlikti episomine (neintegruota į genomą). Rezultate nenuspėjama, kaip ir produkuojamo baltymo ekspresijos lygis taip ir ląstelės linijos stabilumas.

Kitas šio metodo trūkumas tai, kad ekspresijos vektoriaus konstravimas labai sudėtingas, kai interesuojantis genas yra santykinai didelis (didesnis nei 5-10 kilobazių). Dauguma baltymų, ekspresuojamų DNR technologijos pagalba,

koduojami kDNR, o ne didesnių genominių klonų DNR. Tai sumažina bendrą intarpų dydį. Nors, naudojant kDNR genų inžinierija yra patogesnė, nukenčia geno transkripcijos greitis ir baltymų produkcija. Kaip dabar parodyta, didesnis ekspresijos lygis pasiekiamas naudojant genomines o ne kDNR intarpus (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85:836-840, 1988, and Chung and Perry, Mol. Cell. Biol., 9:4395-4405, 1988). Nors mechanizmas, kurio dėka vyksta šie reiškiniai, nėra gerai suprastas, yra žinoma, kad kai kuriais atvejais papildomi elementai, esantys intronuose, gali padidinti geno transkripcinį efektyvumą. Taip pat yra įrodymų, kad intronai arba splaisingas, kuris atsiranda dėka intronų, turi įtakos RNR procesingui, kuris seka po transkripcijos iniciavimo (Buchman and Berg, Mol. Cell. Biol., 8:4395-4405, 1988). Tai gali stabilizuoti transkriptą, tuo pačiu pagerinti iRNR akumuliacijos greitį. Abiejuose cituojamuose Brinster ir kitų straipsniuose postuluojuama, kad intronų padėtis gene gali būti svarbi nukleosomų išsidėstymui promotoriaus atžvilgiu. Įvairių reguliacinių elementų įtaka eukariotų genų transkripcijai yra diskutuojama: Khoury et al, Cell, 33:313-14 (1983), Maniatis et al, Science, 236:1237-45 (1987) ir Muller et al, Eur. J. Biochem., 176:485-95 (1988).

Trečia, tam kad įvesti į branduolį transfekuojamą DNR, su tikslu koduojamu svetimo geno regionu, turi būti pernešta per pralaidžia padaryta ląstelės membraną iki branduolio. Tuo metu DNR gali kontaktuoti su liposomų fermentais, kurie gali pakeisti arba pilnai suardyti DNR. Todėl koduojantis DNR regionas gali būti ne toks, koks būna transfekuojamas.

Naudojant naują genų aktyvacijos ir (arba) ekspresijos modifikacijos metodą, kuris aprašomas žemiau, negaunamos tikslinių baltymų mutacinės formos, todėl kad tikslinio geno koduojantis regionas nėra veikiamas fermentų.

Apibendrinant galima pasakyti: didelė dalis transfekuojamos į ląstelę DNR, naudojant tradicinius metodus, ir ypač koduojantis regionas gali būti neteisingai transkribuojamas. Degradacija gali įvykti prieš įvedant į branduolį, fermentai gali pakeisti koduojamą tikslinį baltymą arba iškirpti reikalingus reguliatorinius segmentus, būtinus transkripcijai. Galimas įsijungimas genomo dalyje, kurioje nevyksta transkripcija. Jei kDNR transkribuojama, tikslinis baltymas gali būti efektyviai neprodukuojamas dėl intronų stokos, kurie padidina arba įgalina efektyvų iRNR procesingą. Pabaigoje, DNR gali išlikti episomine: baltymų produkcija gali būti išsaugoma, bet ląstelės gali būti nestabilios.

Norima buvo patobulinti genų ekspresijos indukcijos metodą taip, kad gauti ląstelių liniją su reikalingais požymiais kaip ir egzistuojančiais metodais, bet be neigiamų reiškinių. Taip pat buvo norima ekspresuoti arba modifikuoti endogeninę ekspresiją norimų genų pasirinktame ląstelių tipe. Buvo norima pasiekti privalumus, kurie gaunami iš pilnos genomo sekos, kuri gali būti sudaryta iš kryptinio transkripcinio sustiprintojo, kuris gali būti intronų viduje, taip pat

tikamai išdėsčius intronus, tam kad vyktų būdingas nukleosomos fazavimas, ar efektyvesnė iRNR sintezė. Paprastai šie privalumai nėra naudojami rekombinantinės DNR ekspresijos metoduose, dėl geno dydžio. Jeigu pavyktų ekspresuoti geną jau esantį genome, tai yra, endogeninį geną, ląstelių linijos stabilumas ir ekspresijos greitis taptų pastovesniu ir nuspėjamu.

Šio išradimo tikslas yra eliminuoti aukščiau paminėtus trūkumus.

Kitas šio išradimo tikslas - sukurti reguliacijos ir (arba) geno ekspresijos sustiprinimo metodą, išsaugant teigiamus rekombinantinės genų technologijos požymius, bet išvengiant neigiamų.

Kitas šio išradimo tikslas - sukurti ekspresijos metodą specifinių genų, kurie normaliai netranskribuojami pasirinktoje ląstelių linijoje.

Dar vienas šio išradimo tikslas - sukurti baltymų ekspresijos metodą, kuris apima pilnas genomines sekas, atsakingas už iRNR kaupimą ir(arba) transkripciją.

Tolesnis šio išradimo tikslas yra pateikti dominančio geno ekspresijos charakteristikų modifikavimo metodą, kai įvedami DNR reguliaciniai ir(arba) amplifikuojantys segmentai į stabilų ląstelių linijų arba klonuotų mikroorganizmų genomą 5' kryptimi, geno viduje arba kitoje vietoje arti dominančio natyvaus geno.

Sekantis šio išradimo tikslas yra pateikti ekspresijos charakteristikų modifikavimo metodą geno, kuris natūraliai yra stabilų ląstelių linijų arba klonuotų mikroorganizmų genome, ir tuo pačiu padaryti taip, kad būtų galima atrinkti ląsteles, kurios buvo tinkamai modifikuotos.

Kitas šio išradimo tikslas yra pertvarkyti genomą taip, kad reguliaciniai ir amplifikuojantys segmentai, kurie natūraliai neegzistuoja, būtų prie dominančio geno koduojančio regiono ar egzono.

Dar vienas šio išradimo tikslas paruošti DNR konstrukcijas, kurios gali būti panaudotos homologinės rekombinacijos tobulinimui.

Sekantis šio išradimo tikslas paruošti ląstelių linijas ir mikroorganizmus, kurie apima genomus, atitinkančius šį išradimą.

Šie ir kiti esamo išradimo objektai buvo tobulinti pasitelkus homologinę rekombinaciją, kurios pagalba su paprastu įgudimu galima iššaukti ekspresiją, greičiau, amplifikaciją esamų, nors netranskribuojamų genų. Šios technikos pagalba kiekvienas gali modifikuoti geną, kuris egzistuoja natūraliai, bet nebūtinai tylinčis ar inertiškas stabilų ląstelių linijos genome, ekspresijos charakteristikas, pavyzdžiui, padaryti sąlyginę ekspresiją, t.y., represyvią ar indukuotą, arba sustiprinti ekspresijos laipsnį.

Šiuo išradimu pateikiamas geno, esančio ląstelės linijos ar mikroorganizmo genome, ekspresijos charakteristikų modifikavimo metodas. DNR konstrukcija yra įterpiama į tą genomą homologinės rekombinacijos pagalba. Konstrukcija turi DNR reguliacinį segmentą, sugebantį modifikuoti ekspresijos charakteristikas bet kokio

geno, prie kurio jis yra efektyviai prijungtas šeimininko ląstelių linijoje ar mikroorganizme, ir taikinio segmentą homologišką genomo regionui, prie kurio turi būti įterptas reikiamas DNR reguliacinis segmentas. Konstrukcija ir įterpimo technika sukurti taip, kad sukeltų naujo DNR reguliacinio segmento efektyvų prisijungimą prie dominančio geno. Todėl, neįterpiant kokį nors naują koduojantį egzoną, ekspresijos charakteristikos yra modifikuojamos. Pateiktoje medžiagoje genas yra tas, kuris yra normaliai tylintis ar inertiškas šeimininko ląstelių linijoje ar mikroorganizme ir kuris DNR reguliacinio regiono pagalba yra nutaikytas tiesiog prie atitinkamos šio geno pozicijos homologinės rekombinacijos pagalba, ir tuo būdu jis yra aktyvuotas savo produkto ekspresijai.

Paprastai DNR konstrukcija turi du taikinio segmentus, kurie, atskyrus vieną nuo kito konstrukcijoje ir įterpti į genomą, greičiausiai yra artimi ir natyviame gene.

Be to konstrukcija paprastai turi mažiausiai vieną ekspresyvų selektyvų markerinį geną, pavyzdžiui suteikiantį atsparumą neomicinui. Šis markerinis genas, turintis promotorių, yra taip pat išsidėstęs tarp dviejų konstrukcijos taikinio regionų.

Kitu atveju konstrukcija turi ekspresyvų amplifikacijos geną, tam kad amplifikuoti mus dominančio geno ekspresiją. Šis, promotorių turintis genas, taip pat yra tarp dviejų konstrukcijos taikinio regionų. Kai kuriais atvejais selektyvus ir amplifikacijos markeris gali būti tas pats.

Sekančioje šio išradimo dalyje DNR konstrukcija turi neigiamą selektyvų markerinį geną, kuris neekspresuojamas ląstelėse, kuriose DNR konstrukcija yra tinkamai įterpta. Šis neigiamas selektyvus markerinis genas yra už dviejų taikinio regionų taip, kad gali būti pašalintas, kai konstrukcija yra tinkamai suderinta homologinės rekombinacijos pagalba. Tokio neigiamo selektyvaus markerinio geno pavyzdys yra Herpes viruso timidinkinazės genas.

Dar kitu atveju, įmanoma modifikuoti ekspresijos charakteristikas specifinio geno, kuris jau ekspresuoja dominantų produktą ląstelių linijoje ar mikroorganizme. Tai gali būti pasiekta įterpiant homologinės rekombinacijos būdu DNR konstrukciją, kuri turi (1) ekspresyvų amplifikacijos geną, kuris didina dominančio geno kopijų skaičių, kai ląstelių linija ar mikroorganizmas yra paveikiamas amplifikacijos sąlygų ir (arba) (2) promotorinį (stiprinantį) elementą, (arba kitą reguliacinį elementą), kuris modifikuoja dominančio geno ekspresiją taip kaip, pavyzdžiui, transkripcijos laipsnio didinimas, translacijos laipsnio didinimas, iRNR kaupimo didinimas, ekspresijos induktyvumo veikimas ir t.t. Geno ekspresija, kuri yra modifikuota šiuo būdu, gali būti natūrali ekspresija arba ekspresija, kuri gali būti iššaukta ląstelių linijos ar mikroorganizmo ankstesnės genetinės manipuliacijos. Minėta genetinė manipuliacija gali būti atlikta įprasta technika

arba remiantis šiuo išradimu homologinės rekombinacijos būdu. Kitu atveju, DNR įterpimas, kurio pasekmė ekspresijos charakteristikų modifikacija, gali būti įvykdytas kaip dalis genetinės manipuliacijos, kuri baigiasi geno ekspresija, arba atliktas kaip sekantis žingsnis.

Šis išradimas taip pat apima konstrukcijas, paruoštas remiantis ankstesnėmis diskusijomis, ir genomus, kurie buvo tinkamai paveikti homologinės rekombinacijos būdu šių konstrukcijų pagalba, bei ląstelių linijas ir mikroorganizmus, turinčius šiuos genomus.

Be to, šiame išradime norimo produkto paruošimo procese taip pat aprašytas transformuotų ląstelių kultivavimas.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig. 1 charakterizuota bendra DNR konstrukcija pagal šį išradimą.

Fig. 2A parodytas DNR konstrukcijos nehomologinės arba atsitiktinės rekombinacijos integracijos į genomą būdas.

Fig. 2B parodytas DNR konstrukcijos homologinės rekombinacijos integracijos į genomą būdas.

Fig. 3 parodyta galima homologinės rekombinacijos vektoriaus konstrukcija pagal šį išradimą.

Fig. 4 parodytas fragmentas žiedinės DNR homologinės rekombinacijos integracijos būdas, kai tik vienintelis DNR fragmentas naudojamas.

Fig. 5 parodyta pRSVCAT plazmidė su kirpimo sritimis joje.

Fig. 6 parodyta pRSV plazmidės konstrukcija su kirpimo sritimis joje.

Fig. 7 parodyta pSV2NEO plazmidė su kirpimo sritimis joje.

Fig. 8 parodyta pSVNEOBAM plazmidės konstrukcija su kirpimo sritimis joje.

Fig. 9 parodyta pRSVNEO plazmidės konstrukcija su kirpimo sritimis joje.

Fig. 10 parodyta pRSVCATNEO plazmidės konstrukcija su kirpimo sritimis joje.

Fig. 11 parodytas žiurkių TSH β geno 15.3 kb fragmentas su kirpimo sritimis jame.

Fig. 12 parodyta pRSVCATNEOTSHB3 plazmidės konstrukcija su kirpimo sritimis joje.

Fig. 13 parodyta pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI plazmidės konstrukcija su kirpimo sritimis joje.

Fig. 14 parodyta dalis TSH β nukleotidų sekos su sritimis, kurioms atitinka kiekvienas GPR amplifikacijos pradmuo. Egzonai 2 ir 3 yra parodyti didžiosiomis raidėmis. 247 bazių porų amplifikuojami fragmentai parodyti pabraukiant žvaigždutėmis.

Fig. 15 parodyti rezultatai elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje kDNR, susintetintos iš RNR, ekstrahuotos iš įvairių ląstelių populiacijų ir kurios TSH β cDNR, jei aptikta, buvo amplifikuota PCR keliu. Ląstelių prigimtis nurodyta žemiau gelio.

Homologinės rekombinacijos metodas išvystytas per paskutinius kelis metus ir skirtas pakeisti genus arba pataisyti mutaciją transkriptiškai aktyviuose genuose (Kucherlapati, *Prog. in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.*, 36:301 (1989)). Šis homologinės rekombinacijos metodas buvo išvystytas kaip metodas specifinėms mutacijoms iššaukti specifiniuose žinduolių genomų regionuose (Thomas et al., *Cell*, 44:419-428, 1986; Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503-512, 1987; Doetschman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:8583-8587, 1988) arba koreguoti specifinės mutacijas defektiniuose genuose (Doetschman et al., *Nature*, 330:576-578, 1987).

Šio metodo pagalba DNR segmentas, kurį norima įterpti į genomą, gali būti nukreipiamas į interesuojamo geno specifinį regioną prijungiant jį prie "taikinio DNR". "Takinio DNR" yra DNR, kuri yra komplementari (homologinė) genominei DNR regionui. Jei dvi homologinės vienspiralės DNR dalys (tai yra taikinio DNR ir genominė DNR) yra labai artimos, tai jos hibridizuojasi sudarydamos dvispiralę. Prijungiama prie taikinio DNR yra DNR seka, kurią norime įterpti į genomą.

Yra daugybė metodų, kurių pagalba pasireiškia homologinė rekombinacija. Pavyzdys - DNR replikacijos proceso metu, kai vyksta ląstelių mitozė.

Mechanizmo, kuris nėra pilnai suprantas, pagalba, tėvinė dvispiralė DNR yra staigiai išardoma prieš ląstelės skilimą lokaliame regione, vadinamame replikacijos burbulu. Dvi išskirtos DNR grandinės tarnauja kaip pagrindas, nuo kurio sintezuojama nauja DNR grandinė. Viena replikacinė atšaka turi DNR kodą nuo 5' į 3' kryptimi, kuri yra tinkama orientacija nuo kurios fermentas DNR polimerazė gali "nuskaityti". Šis fermentas sąveikauja su 5' galu vienspiralės DNR ir atitinkamai grandinei pradeda sintetinti komplementarią DNR. Kita tėvinė DNR grandinė yra koduojama nuo 3' į 5' kryptimi. Ji negali būti DNR polimerazės nuskaityta šia kryptimi. Šiai DNR replikacijos mechanizmas yra specialus.

Specializuotas fermentas, RNR praimazė, prisijungia prie 3' 5' DNR grandinės ir sintetina trumpą RNR pradmenį su intervalais grandinėje. Panaudojant šiuos trumpus RNR segmentų pradmenis, DNR polimerazė jau gali prisijungti prie pradmens ir sintetina komplementarią dalį DNR 5' 3' kryptimi. Šios naujai susintetintos DNR dalys yra vadinamos Okazaki fragmentais. RNR pradmenys, kurie yra atsakingi už pilną reakciją yra pašalinami egzonukleazine DNR polimerazės funkcija ir pakeičiami DNR. Šis reiškinys tęsiasi tol, kol pasiekia DNR šaką, neturinčią pradmens, čia ir sustoja lokalinis sintezės procesas. Taigi, nors komplementari tėvinė šaka yra ištiesai sintetinama 3' 5' kryptimi, ištikrųjų

"susiuvama" 5' 3' kryptimi. Jokių trūkių, kurie gali atsirasti DNR "susiuvimo" metu, nebūna, nes jie sujungiami fermentu, vadinamu DNR ligaze.

Absoliučiam DNR kodų adekvatumui patvirtinti, teisingai nuskaitymo funkcijai yra naudojama DNR polimerazė. DNR polimerazei reikalingi DNR pradmenys nuo kurių sintetinama nauja DNR spiralė. Kaip pažymėta aukščiau, tai gali būti vienguba DNR grandinė, kuri sintetinama pradmenų pagalba su RNR, arba komplementari DNR grandinei. Kai DNR polimerazė suranda neatitikimą komplementariam DNR gabale, ji gali veikti kaip endonukleazė ir pašalinti DNR bazes 3' 5' kryptimi, kol nepakeičia klaidingų sričių.

Tai žinant, galima suprasti aprašyto metodo pagrindus. Maži gabalai taikinio DNR, kuri yra komplementari specifiniam genomo regionui, sąveikauja su tėvine DNR grandine replikacijos proceso metu. Tai pagrindinė DNR, kuri įterpiama į hibridizuojamą ląstelę, savybė ir todėl rekombinuoja su kitais DNR gabalais išmėtytais homologiniame regione. Jei ši komplementari grandinė yra prijungiama prie oligonukleotido, kuriame yra mutacija arba skirtumai DNR sekoje, tai taip pat ji įjungiama į naujai sintetinamą grandinę, kaip rekombinacijos rezultatas. Teisingo nuskaitymo funkcijos rezultate galima gauti naują DNR seką, kuri tarnauja matrica. Taigi, transfekuojama DNR yra įjungiama į genomą.

Jei tam tikro geno seka žinoma, tai gabalai DNR, kurie yra komplementarūs pasirinktam geno regionui, gali būti susintetinti arba kitu būdu gaunami, tokiu kaip atitinkama restrikcija natyvios DNR specifiniuose atpažinimo vietose, interesuojančiame regione. Šis gabalas naudojamas kaip taikiny s įvedimui į ląstelę ir gali hibridizuotis su jam homologiniu genomo regionu. Jei ši hibridizacija vyksta DNR replikacijos metu, tai šis DNR gabalas ir bet kokia papildoma prijungta seka, gali veikti kaip Okazaki fragmentas ir gali susiūti į naujai sintetinamą dukterinę DNR grandinę.

Šiame išradimo metode šie gabalai prijungti prie taikinio DNR yra DNR regionai, kurie yra žinomi, kad sąveikauja su reguliatoriniais baltymais, esančiais ląstelėje, ir nebūtinai ekspresiją sustiprinančiais ir DNR selektyvumo markeriais. Taigi, specifinių baltymų ekspresija gali būti pasiekta ne per DNR transfekciją, kuri koduoja patį geną ir DNR markerius, kaip plačiausiai naudojamas, bet geriau naudojant taikinio DNR (homologiniai regionai su dominančiu endogeniniu genu) sujunta su DNR reguliatoriniais segmentais, kurie padaro geną atpažįstamą transkripcijai. Su šio metodo pagalba galima ekspresuoti ir sustiprinti ekspresiją bet kokio giminingo geno, kuris yra tame ląstelės tipe, be šio geno transfektingo. Papildant, šio geno ekspresija kontroliuojama visa genomine DNR, o ne geno dalimis arba kDNR, tuo būdu padidina transkripcijos greitį ir iRNR procesingo efektyvumą. Be to bet kokio giminingo geno, esančio tame ląstelės tipe, ekspresijos

charakteristikos gali būti modifikuojamos atitinkamu intarpu su pilnu koduojančiu genu.

Sutinkamai su šiais aspektais, šis išradimas įgalina nauju metodu ekspresuoti normaliai transkriptiškai inertiškus dominančius genus arba modifikuoti ekspresiją endogeniškai ekspresuojamų genų diferencijuotoje ląstelėje. Giminingos genominės sekos, kurias norima ekspresuoti, arba modifikuoti jų ekspresiją, turi būti papildytos reikalingomis ląstelei specifinėmis DNR sekomis (regulatorinėmis ir (arba) ekspresijos sustiprinimo segmentais) tam kad būtų galima valdyti arba modifikuoti ląstelėje esančių genų ekspresiją. Galutinė DNR apima DNR seką, koduojančią norimą baltymą, sujungtą su heterologine (gimininga DNR seka) reguliaciniais ir (arba) amplifikaciniais segmentais. Teigiamas atrinkimo markeris pasirinktinai įjungiamas į konstrukciją, tam kad būtų galima atrinkti pakeistas ląsteles. Pirmenybė teikiama atsparumo neomicinui genams net jei naudojami ir kiti markeriai. Neigiami atrinkimo markeriai nebūtinai gali būti naudojami. Pavyzdžiui, Herpes viruso timidinkinazės (HSVtk) genas gali būti naudojamas kaip atrankos markeris atrinkti nuo atsitiktinai integruotų vektorių DNR. Sulietos DNR arba esančios ekspresuojamos DNR gali būti amplifikuojamos, jei taikinio DNR yra sujungiama su amplifikacijos markeriu.

Taip pat, pagal pateikiamo išradimo metodą bet koks specifinės eukariotų ląstelės, ypačiai diferencijuotų ląstelių, genas, kuris yra normaliai ekspresuojamas gali stimuliuoti ekspresiją ląstelių linijoje, kurioje normalioje būsenoje neekspresuojami. Tai pasireiškia ir be įterpimo pinos DNR sekos šiam genui. Papildomai, šis genas arba normaliai ekspresuojamas genas gali būti amplifikuojamas ekspresijos greičiui padidinti. Papildomai, genų, kurie nepilnai neekspresuojami, ekspresijos charakteristikos gali būti modifikuojamos kaip ir mikroorganizmų ląstelių ekspresijos charakteristikos.

Vienoje pateikiamo išradimo dalyje eukariotinės ląstelės, kurios turi, bet nenormaliai transkribuojamą specifinį dominantį geną, indukuojamos čia aprašomo metodo pagalba. Homologinis rekombinacinis vektorius, kuris yra žemiau aprašomas, įterpiamas į ląstelių kloną ir cheminės selekcijos pagalba stebima specifinio geno produkcija bet kuriuo būdu, tokiu kaip, pavyzdžiui naujai aktyvuoto geno transkribuojamos iRNR nustatymas, imunologinė specifinių geno produktų analizė arba specifinio geno produkto aktyvumo nustatymas.

Bendras DNR konstrukcijos, kuri naudojama transkriptiškai aktyvuoti endogeniniam genui homologinės rekombinacijos metodu, planas pavaizduotas Fig.1.

Bendrai DNR konstrukcija susideda mažiausia iš dviejų iki šešių arba daugiau atskirų DNR segmentų. Segmentai susideda iš mažiausia iš vieno, paprastai iš dviejų, DNR taikinio segmentų (A ir B) homologinių ląstelės genomo

regionui arba artimo ekspresuojamam genui, teigiamos selekcijos geno (C), amplifikacijos geno (D), neigiamos selekcijos geno (E) ir DNR reguliacinio segmento (F), kuris transkribuojamas ląstelėse, kurios transfekuojamos. Pagrindiniuose pateikiamo išradimo dalyse naudojami tik vienas taikinio segmentas (B) ir reguliacinis segmentas (F). Visi kiti regionai yra nebūtini pasirenkant konstrukciją.

Regionai A ir B yra DNR sekos, kurios yra homologinės interesuojamo endogeninio geno regionams, kuriuos norima padaryti transkribuojamais. Specifiniai endogeninio geno regionai A ir B pasirenkami atitinkamai 5' arba 3' krypties, kurioje norima, kad reguliacinis segmentas būtų įterpiamas. Nors šie regionai išskirti konstrukcijoje, bet pageidujama, kad jie būtų vientisi endogeniniame gene. Galimi atvejai kai naudojamos nevientisos genomo, kuris naudojamas taikinio segmentu, dalys, pavyzdžiui, gali būti iškirpta dalis genomo, tokia kaip negatyvus reguliacinis elementas.

Kai pasirenkami du taikinio regionai A ir B, tam kad padidinti homologinį regioną ir rekombinacijos efektyvumą, pateikiamas išradime metodas taip pat įgalina panaudoti tik vieną taikinio regioną. Šiame paprastesniame būde (kai tik įvedami reguliacinis segmentas F, selektyvaus markerio genas C ir promotorius C') yra naudojama plazmidinė DNR, kuri susideda iš elementų kartu su taikinio DNR (žiūr. Fig. 4). Šiuo būdu, homologinis regionas (B) hibridizuojasi su atitinkančia genomine dalimi. C' segmentas, C ir F yra įvedami į giminingą geno B dalį krosingoverio pagalba.

Kai norima kad DNR reguliacinė seka būtų įvesta 5' kryptimi į interesuojamą geną, pavyzdžiui, kai norima aktyvuoti ir ekspresuoti normaliai netranskribuojamą geną, pageidaujama, kad homologinis regionas būtų nekoduojančioje genomo dalyje, 5' kryptimi koduojančiai dominančio geno daliai. Kai yra du taikinio regionai, 5' krypties regionas (A) turi turėti savyje 5' krypties (A) dalį, kuri turi turėti savyje koduojantį regioną, nors pageidaujama, kad ištisas koduojantis regionas eitų po. Papildomai pageidaujama, kad homologiniai regionai būtų pasirenkami taip, kad DNR reguliacinė seka būtų įvesta 5' krypties natyviu interesuojamo geno promotoriui, ypač kai natyvus promotorius yra negatyvus, o ne reguliuojamas teigiamas promotorius.

Taikinio regionų dydis, tai yra, homologijos regionų, nėra kritinis, nors trumpesni regionai su mažesne tikimybe suras atitinkamus homologinius regionus ir rekombinuosis norimoje vietoje. Taigi, trumpesni homologiniai regionai mažiau efektyvūs homologinėje rekombinacijoje, tai yra, gaunama mažesnė dalis sėkmingai rekombinuotų klonų. Nustatyta, kad mažiausia homologinei sekai reikalingos 25 bazių poros (Ayares et al, PNAS, USA, 83:5199-5203, 1986). Jeigu bet koks kitas konstrukcijos elementas surandamas šeimininko ląstelės genome, tai rekombinacija gali vykti klaidingoje vietoje. Kadangi šio metodo galimybės vykdyti

teigiamą ir neigiamą atranką yra puikios, jis gali būti sėkmingai panaudotas net ir tais atvejais, kai efektyvumas mažas. Optimalūs rezultatai pasiekiami, kai bendras homologinis regionas, kuris susideda iš abiejų taikinio regionų, yra didelis, pavyzdžiui, nuo vienos iki trijų kilobazių. Regulatorinis F segmentas gali būti tokio ilgio, kokį dar galima operatyviai sujungti su interesuojančiu genu, jo ilgis nelimituojamas taikinio regionu ir ypatingai kai taikinio regionas yra 3' krypties.

Empyriškai lengva nustatyti ar taikinio regionas yra per ilgas, ar reguliacinis segmentas F išsidėsto per toli nuo koduojamo prijungiamo geno regiono. Tokiu būdu, regionai A ir B gali būti padaryti homologiniais skirtingose interesuojamo geno dalyse ir procesas kartojamas tol, kol reguliacinis segmentas F tinkamai bus įterptas ir sujungtas su interesuojamu genu. Pavyzdžiui, restrikcijos sritis sujungtų endogeninio geno regionų A-B gali būti pakeista ir procesas pakartotas. Žinant šio išradimo koncepciją ir čia aprašytus metodus, kiekvienas, turintis įgūdžių šioje srityje, galės jį panaudoti bet kokiam genui, bet kokioj ląstelių linijoj ar mikroorganizme, nedarant jokių preliminarinių eksperimentų.

Regionas C yra teigiamas geno selekcijos markeris, kuris gali perteikti transfekuotai ląstelių linijai atsparumą normaliai toksiškai terpei. Tokių genų pavyzdžiai yra tokie kaip: adenoindeaminazė (ADA), aminoglikozidfosfotransferazė (neo), dihidrofolatreduktazė (DHFR), higromicin-B-fosfattransferazė (HPH), timidinkinazė (tk), ksantino-guanino fosforiboziltransferazė (gpt), keliems reaktyvams atsparumo genas (MDR), ornitindekarboksilazė (ODC) ir N-(fosfonacetil)-L-aspartatui atsparumo (CAD).

Papildomai prie teigiamo selekcijos markerio geno įjungiamas į konstrukciją amplifikacijos genas prie regiono D. Amplifikacijos genai, tai tokie genai, kurie padidina kopijų skaičių, esant teigiamam poveikiui. Genų, išdėstytų greta amplifikacijos geno, kopijų skaičius dar padidėja. Amplifikacijos genai įjungiantys DHFR, MDR, ODC, ADA ir CAD gali būti panaudojami. Šie markeriniai selekcijos genai ir amplifikuojantys genai persidengia taip, kad teoriškai, vietoj dviejų genų, vieno atrankai ir vieno amplifikavimui, gali būti panaudotas vienas genas abiem tikslams. Kadangi dauguma ląstelių linijų turi endogenines kopijas šių amplifikavimo genų, ląstelės gali būti atsparios atrankos sąlygoms ir tada sunku atrinkti ląsteles, kuriose įvyko transfekcija. Tais atvejais, kai reikalingas amplifikacijos genas, teigiamos selekcijos genas, kuris yra dominuojantis, toks kaip HPH, gpt, neo ir tk (tk_ ląstelėse), turi būti įjungtas į konstrukciją. Kai kuriais atvejais yra galimybė ar pirmenybė neįtraukti amplifikacijos markerį. Interesuojantis genas gali nereikalausti amplifikacijos kaip, pavyzdžiui, transkripcinė aktyvacija heterologine DNR reguliacine seka yra pakankama ir be amplifikacijos. Taip pat, jei homologinės rekombinacijos efektyvumas yra žemas, tai būtina neįjungti amplifikacijos geną, todėl, kad santykis nehomologinės DNR

su homologine DNR tiesiogiai surištas su homologinės rekombinacijos efektyvumu (Letsou, Genetics, 177:759-770, 1987). Taip pat galima eliminuoti teigiamą selekcijos geną ir atrinkti ląsteles tikrai tikrinant produkciją reikalingo baltymo arba iRNR. Geriau yra daugumoje atvejų įjungti bent teigiamą selekcijos geną.

Konstrukcijos regionas E yra neigiamas selekcijos markerio genas. Toks genas neekspresuojamas ląstelėse, į kurias DNR konstrukcija tinkamai įterpiama homologinės rekombinacijos pagalba, bet ekspresuojamas ląstelėse, į kurias DNR konstrukcija įterpiama klaidingai, atsitiktinės integracijos būdu. Vienas iš tokių genų yra *Herpes* viruso timidinkinazės genas (HSVtk). HSVtk turi mažesnę griežtumą nukleotidams ir jis pajėgia fosforilinti nukleotidų analogus, o to normalios žinduolių ląstelės nesugeba. Jei HSVtk yra ląstelėse, tai nukleotidų analogai, tokie kaip aciklovir ir ganciklovir yra fosforilinami ir įjungiami į šeimininko ląstelę ir nužudo ląstelę. Esant neigiamam selekcijos markeriui, homologinės rekombinacijos metu įgalina vygdyti teigiamą-neigiamą selekciją pagal Mansour et al (Nature, 336:348-352, 1988). Capecchi naudojama strategija suteikia galimybę palyginti skirtingus integracijos būdus, kurie galimi, kai tiesinis DNR vektorius įterpiamas homologinės rekombinacijos pagalba su tarpais, kurie gaunami atsitiktinės integracijos pagalba. Jei DNR vektorius įterpiamas atsitiktinės integracijos pagalba, tai dauguma tarpų įterpiami per galus (Folger et al, Mol. Cel. Biol., 2:1372-1387, 1982; Roth et al, Mol. Cel. Biol., 5:2599-2607, 1985 ir Thomas et al, Cell, 44:419-428, 1986). Kitu atveju, jei vektorius įterpiamas homologinės rekombinacijos pagalba, tai gali rekombinuotis per homologijos regionus, ko pasekoje prarandamos sekos, kurios yra už šių regionų.

Naudojant konstrukciją pavaizduotą Fig.1, homologinės rekombinacijos palyginimas su atsitiktine integracija iliustruotas Fig. 2A ir 2B. Nehomologinės rekombinacijos atveju (Fig. 2A) vektorius įterpiamas per konstrukcijos galus. Tai įgalina regioną E, šiuo atveju HSVtk genas, įterpti į genomą. Nors, kai vyksta homologinė rekombinacija (Fig. 2B), HSVtk genas prarandamas. Pirmas selekcijos etapas - pasirinkimas tinkamo teigiamos selekcijos reaktyvo arba selekcijos sąlygų pasirinkimas. Ląstelės, turinčios integruotą DNR, kaip homologinės rekombinacijos pagalba, taip ir atsitiktine integracija, turi turėti šį selekcijos etapą. Išlikusios ląstelės turi būti išlaikomos su selekcijos reagentu, tokiu kaip gancikloviru, kuris nužudo visas ląsteles, kurios turi HSVtk geną. Tuo būdu, dauguma ląstelių, į kurias vektorius yra integruojamas atsitiktinės integracijos pagalba, turi HSVtk geną ir yra nužudomos selekcijos reaktyvo, o tos ląstelės, į kurias vektorius įvedamas homologinės rekombinacijos pagalba praranda HSVtk geną ir išgyvena. Tai įgalina atskirti daugumą ląstelių, kurios turi integruotą DNR atsitiktinės integracijos pagalba, nuo ląstelių, kurios turi sąvyje DNR, įvestą homologinės rekombinacijos pagalba. Tai labai palengvina teisingos rekombinacijos indentifikavimą.

Negatyvios selekcijos etapas taip pat gali būti eliminuojamas, jei tai būtina. Tai reikalauja, inensyvesnio atrinkimo etapo, reikalaujančio tokių metodų, kaip grandininės polimerazinės reakcija (GPR) arba imunologinio tyrimo.

Šeštas regionas (F) turi sąvyje reguliacinį DNR segmentą, kuris naudojamas interesuojamo geno transkripciniam aktyvumui padidinti. DNR reguliacinio segmento pasirinkamas priklauso nuo ląstelių tipo. Paprastai reguliacinis segmentas pasirenkamas toks, kad apie jį žinoma, kad jis palaiko diferencijuotų ląstelių linijos geno ekspresiją. Pavyzdžiui, jei šeimininko ląstelės yra hipofizio ląstelės, kurios natūraliai ekspresuoja tokius baltymus, kaip augimo hormoną ir prolaktiną, kiekvieno iš šių genų promotorius gali būti naudojamas kaip DNR reguliacinis elementas F. Pagal šį išradimą įterpus, reguliacinis segmentas prijungiamas prie normaliai neekspresuojamo interesuojamo geno, gali stimuliuoti transkripciją ir (arba) šeimininko ląstelių linijos geno ekspresiją. Taip pat galima naudoti sumaišytus DNR reguliacinius elementus, kurie veikia įvairiose ląstelių tipuose, tokius kaip Rous sarkomos viruso (RSV) promotorius. Kol reguliacinis segmentas stimuliuoja transkripciją ir (arba) ekspresiją, ar gali būti indukuojama transkripcijos stimuliacija ir (arba) ekspresija interesuojamo geno po to, kai jis įterpiamas į šeimininko ląstelės liniją, kuris prijungiamas prie interesuojamo geno pagal šį išradimą, toks reguliatorinis segmentas gali būti naudojamas šiame išradime. Kai jungiamas reguliacinis segmentas F prie taikinio segmento A svarbu, kad nebūtų pradžios kodonas atsitiktinai įvestas į seką, todėl kad negali būti pakeistas ekspresuojamo geno skaitymo rėmelis. Žinoma, konstrukcija turi būti sudaryta ir įterpta taip, kad reguliacinis segmentas F būtų prijungtas prie interesuojamo geno.

DNR reguliacinio segmento, regiono F, gali nebūti tais atvejais, kai jis reikalingas išplėsti ar amplifikuoti geno transkripciją, kuri egzistuoja pasirinktoje ląstelėje, todėl, kad jis natūraliai ekspresuojamas šiose ląstelėse, ar ląstelių linijos DNR turi būti pakeista taip, kad būtų iššaukta ši ekspresija. Kai kuriais atvejais įvedus amplifikuojantį geną, regioną D, kartu su teigiamu selekcijos markerio genu, regionu C, ir nebūtinai su neigiamu selekcijos markerio genu, regionu E, pakanka tam, kad padidėtų interesuojamo geno kopijų skaičius ir kad padidėtų transkripcija. Taip pat, jei naujas reguliacinis segmentas, regionas F, iš esmės aktyvuoja (ar kitaip modifikuoja), transkripcijos greičio padidėjimą, palyginus su egzistuojančiu interesuojamo geno reguliacijos regionu, jis gali būti įvestas egzistuojančiai interesuojamo geno transkripcijai padidinti. Toks naujas reguliacinis segmentas gali turėti sąvyje promotorius arba sustiprintojus, kurie padidina transkripcijos efektyvumą.

Regionai C', D' ir E' yra promotoriaus regionai, ir yra naudojami valdymui atitinkamų regionų: C, D ir E. Šie promotoriai transkribuojami pasirenkamoje

ląstelių linijoje ir gali būti tokie pat ar skirtingi, nei regiono F promotoriai, kurie valdo interesuojamą endogeninį geną. Transkripcijos kryptis, pažymėta Fig. 1, nėra kritinė. Šio būdo dėka galima pasirinkti genų C, D ir E ir jų promotorių vietą, taip, kad šie promotoriai stimuliuotų asocijuotus genus, be interesuojamo geno sugadinimo ar bet kokių kitų genų konstrukcijos pažeidimų.

Pateikiamas išradimas gali būti iliustruotas žiurkių -tyrotropino subvieneto (TSH) aktyvacija GH₁ (ATCC CCL 82), GH₃ (ATCC CCL 82.1) arba GH₄, ląstelių linijose (GH). GH ląstelių linijos kilusios iš radiacija žiukėse indukuoto hipofizio auglio, jos žymimos MtT/W5 (Takemoto, Cancer Res., 22:917, 1962) ir adaptuotos auginimui kultūroje Tashjian et al, Endocrinology, 82:342-352, 1968. Šių ląstelių linijos gali būti subklonuotos ir atrinktos pagal jų sugebėjimą produkuoti augimo hormoną ir TSH. Tokia atranka gali būti atlikta Northern blotavimo pagalba, nustatant žirkių augimo hormono geno iRNR ir įrodant, kad šis genas yra ir TSH geno iRNR neprodukuojama. Taip pat ląstelės gali būti tikrinamos Southern blotavimo pagalba, tam kad nustatyti ar tikrai yra bet viena TSH geno kopija genome. Tolesniam darbe naudojamos tik tos GH ląstelės, kurios produkuoja augimo hormoną, bet ne TSH, bet turinčios TSH geno kopiją.

Specifinis homologinės rekombinacijos vektorius gali būti toks (Fig. 3). Regionas A turi turėti 5' krypties netransliuojamą TSH geno segmentą, iškirptą HindIII pagalba nuo -74 iki -2785 ir regionas B turi turėti apie 2,1 kb DNR fragmentą, kuris iškerpamas HindIII pagalba nuo -2785 iki NcoI saito yra aprašytas Carr et al (J.Biol. Chem., 262:981-987, 1987) ir Croyle et al (DNA, 5:299-304, 1986). Teigiamos atrankos genas (regionas C) gali būti 1067 bp ilgio, BglII-SmaI pagalba gautas fragmentas iš plazmidės pSV2neo (ATCC No. 37, 149) (Southern et al, J. Mol. Appl. Gen., 1:327-341, 1982). Genas neo gali būti valdomas Rous Sarkomos viruso (RSV) promotoriaus pagalba (regionas C'), kuris paimamas iš NdeI-HindII fragmento plazmidės pRSVcat (ATCC No. 37,152) (Gorman et al, PNAS, 79:6777-6781, 1982). Šiame pavyzdyje nereikalinga naudoti amplifikacijos markerio, todėl nereikalingi regionai D, tam kad būtų optimizuotas homologinės rekombinacijos efektyvumas. Efektyvumas atvirkščiai proporcingas nehomologinės sekos santykiui su homologinėmis sekomis, esančiomis šioje konstrukcijoje (Letsou et al, Genetics, 177:759-770, 1987). Regionas E, arba neigiamos selekcijos genas, gali būti iš HSVtk geno, kurio Xho fragmentas 2 kb dydžio paimamas iš plazmidės pMCITK (Capecchi et al, Nature, 336:348-352, 1988). Šioje konstrukcijoje genas HSVtk gali būti paimamas iš polinomos viruso promotoriaus ir sustiprintojas (regionas E') sukonstruotas pagal Thomas et al (Cell, 51:503-512, 1987). Sekančioje DNR konstrukcijoje polinomos promotorius gali būti pakeistas RSV promotoriu, aprašytu aukščiau. DNR reguliacinė seka, kuria aktyvuojamas TSH genas, gali būti kaip RSV promotorius, taip ir žiurkių augimo hormono promotorius. Žiurkių augimo

hormono promotorius yra SacI-EcoRI fragmete, gaunamas iš plazmidės pRGH237CAT (Larson et al., PNAS, 83:8283-8287, 1986). RSV promotorius gali būti naudojamas ne tik GH ląstelėse, nes GH promotorius aktyvus GH ląstelėse ir gali būti specifiskai indukuotas (Brent et al., J. Biol. Chem., 264:178-182, 1989). Žiurkių augimo hormono promotorius ir RSV promotorius atskirose konstrukcijose gali būti įvestas F pozicijoje.

Po šios konstrukcijos transfekcijos į GH ląstelių liniją, ląstelės gali augti terpėje, kurioje yra G418. Tai leidžia augti tik tomis ląstelėms, kuriose yra integruota DNR plazmidė į genomą kaip homologinės rekombinacijos, taip ir atsitiktinės integracijos pagalba. Išgyvenusios ląstelės augs ir terpėje, kurioje yra gancykloviro. Dauguma ląstelių išlaikusių šią sekenciją, bus tos, kuriose DNR plazmidės vektorius integruotas homologinės rekombinacijos pagalba. Šios ląstelės gali būti skringuojamos, tam kad įrodyti, kad jos produkuoja iRNR, kuri atitinka TSHβ geną ir kad jos produkuoja TSHβ baltymą. Genominės DNR sritis, į kurią įvedamas heterologinis promotorius, gali būti sekvenuojamas tam, kad įrodyti, kad rekombinacija teisingai įvyko.

PAVYZDYS - TSHβ geno aktyvacija žiurkių hipofizio ląstelėse

Naudojant žemiau aprašytą metodiką, tyrotropino beta subvieneto (TSHβ) geno transkripcija, kuri normaliai nevyksta žiurkių GH₃ hipofizio ląstelėse, aktyvuojama šiose ląstelėse homologinės rekombinacijos pagalba, įvedant aktyvuojantį elementą 5' kryptimi TSHβ kodavimo regionui. Yra žinoma, kad Rous sarkomos viruso (RSV) promotorius efektyviai funkcionuoja GH₃ ląstelėse (Christian Nelson et al., Nature, 322:557-562, 1986); Zheng-Sheng Ye et al., The Journal of Biological Chemistry, 263:7821-7829, 1988), ir todėl pasirenkamas aktyvuojančiu elementu. Plazmidės vektorius konstruojamas taip, kad turėtų RSV aktyvuojantį elementą, 5' flankuojančią TSHβ geno dalį ir reaktyvo selekcijos markerį, aminoglikozidfosfototransferazės geną (NEO), reikalingą transfektuotų ląstelių populiacijų atrankai. Ribonukleininė rūgštis (RNR) ekstrahuojama iš GH₃ ląstelių, kurios išlieka atsparios selekcijos reaktyvui, ir paverčiama į komplementarią dezoksiribonukleininę rūgštį (kDNR). Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) pagalba patikrinama ar kDNR yra TSHβ. Homologinės rekombinacijos vektoriai ir kontrolės vektoriai yra aprašomi eksperimente ir rezultatuose.

PLAZMIDĖS KONSTRAVIMAS

Homologinės rekombinacijos (HR) vektoriaus (pRSVCATNEO) karkasas

Rous sarkomos viruso (RSV) promotorius konstruojamas iš plazmidės pRSVCAT (Cornelia M. Gorman et al., Proceedings of National Academy of Science, 79:6777-6781, 1982) (Fig. 5) išskiriant 580 bazių porų (bp) NdeI-HindII fragmente esantį funkcionuojantį promotorių. Šio fragmento galai užbukinami DNR polimerazės I Klenovo fragmento pagalba ir XbaI linkeriai liguojami prie bukų

galų. Po nuskėlimo XbaI restrikcijos endonukleazės pagalba ir valymo, gautas fragmentas liguojamas pUC18 plazmidės XbaI saite. Bakterijų kolonija, turinti plazmidę, kurioje yra RSV intarpas schematiškai parodyta Fig. 6, toliau žymima pRSV. Aminoglikozidfosfotferazės genas (NEO) klonuojamas iš pSV2NEO (P.J. Southern et al, *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1:327-341, 1982) išskiriant BglII ir BamIII (Fig. 7) fragmentą ir liguojant prie BamHI saito pRSV plazmidės (Fig. 6). Plazmidė, kurioje yra NEO genas schematiškai pavaizduota piešinėlyje 8 ir yra žymima pRSVNEOBAM. pRSVNEOBAM plazmidė kerpama SmaI pagalba ir 4328 bp fragmentas, kuriame yra RSV promotorius ir pagrindinė NEO geno ir plazmidės pUC18 dalis, išskiriamas elektroforezės pagalba. Suliguoti XhoI likeriai SmaI galuose nukerpami XhoI restrikcijos fermento pagalba ir plazmidė ligavimo pagalba vėl sujungiama į žiedą. Gauta plazmidė pavaizduota Fig. 9 ir vadinama pRSVNEO. Paskutinio klonavimo rezultate iškerpamas iš NEO nuo 3' galo 786 bp ilgio fragmentas, kuris nėra būtinas funkcionaliai ekspresijai. Šios konstrukcijos dėka gaunama plazmidė su NEO genu, kuri transkriptiškai reguliuojama RSV promotoriumi.

Sekantis NdeI saitas, esantis 5' RSV promotoriaus gale, plazmidėje pRSVCAT (Fig. 5) pervedamas į SalI saitą. Tai pasiekama sulkaldant pRSVCAT plazmidę su NdeI, DNR polimerazės I Klenovo fragmentu užpildant galus ir liguojant bukus galus SalI linkeriais. Linkeriai nukerpami su SalI ir plazmidė reciklizuojama ligavimo pagalba. Naujai sukonstruotame SalI saite yra klonuotas SalI-XhoI fragmentas iš pRSVNEO plazmidės (Fig. 9), kuriame yra RSV promotorius iš NEO geno. Plazmidė, pavaizduota Fig.10, su RSV promotoriumi ir NEO genu iškirta ir pavadinta pRSVCATNEO. Ši plazmidė transfekuota į GH₃ ląsteles, suteikia šioms ląstelėms atsparumą G418, sugebėjimą RSV promotoriumi reguliuoti NEO geno transkripciją ir sugebėjimą RNR transliuoti į funkcinius baltymus (duomenys nepateikiami). Šių transfektantų RNR analizuojama polimerazinės grandininės reakcijos pagalba (PGR), kad nustatyti ar CAT genas yra transkribuojamas. PGR rezultatai parodė, kad CAT genas tikrai transkribuojamas visose G418 atspariose ląstelių kolonijose (duomenys nepateikiami) ir kad RSV promotorius CAT geno 5' gale sugeba reguliuoti transkripciją geno esančio 3' gale. Tai svarbu, nes šis RSV promotorius gali būti atsakingas už TSHβ geno transkripcijos reguliavimą, kai TSHβ HR vektorius, kuris aprašomas vėliau, integruojamas homologinės rekombinacijos pagalba į GH₃ genomą.

TSHβ HR vektorius

Vektorius, sugebantis integruotis į GH₃ genomą homologinės rekombinacijos pagalba, sukonstruojamas įterpiant dvi sekas 5' flankuojančių regionų iš tirotropino beta subvieneto (TSHβ) geno į unikalų SalI ir HindIII saitą, esantį pRSVCATNEO plazmidėje (Fig. 10). Žiurkės blūžnies genomine biblioteka,

kurioje yra 15 kilobazių (kb) ar didesni intarpai, klonuota į lambda DASH buvo gauta iš Stratagene, San Diego, CA. Panaudojus standartines oeracijas (Current protocols in Molecular Biology, pp.1.9.1-1.13.6, 6.1.1-6.4.10), buvo išskirtas žiurkių genominis TSH geno 15,3 kb klonas, kuriame yra 9 kb ilgio 5' seka iš pirmo egzono. 15,3 kb ilgio fragmentas susideda iš dviejų XbaI fragmentų, 10,6 kb fragmentas yra 15,3 kb fragmento 5' gale ir 4,7 kb dalis yra 15,3 kb fragmento 3' gale (Fig. 11). Abu šie XbaI fragmentai subklonuoti į pUC18 ir plazmidės, turinčios intarpus abiejomis orientacijomis yra išskirtos. 2,3 kb XbaI - HindIII fragmentas įeina į 4,7 kb XbaI fragmentą (Fig. 11) buvo išvalytas ir XbaI šio fragmento saitas pakeistas HindIII saitu su Klenovo fragmento pagalba ir buvo liguojamas HindIII linkeriais. Šis fragmentas buvo suliguotas su unikaliu HindIII saitu, kuris yra pRSVCATNEO plazmidėje (Fig. 10). Darinys, atitinkantis plazmidei su 2,3 kb intarpu, su teisinga orientacija parodytas Fig. 12 pažymėtas pRSVCATNEOTSHB3.

10,6 kb XbaI fragmentas iš žiurkių TSH klonu (Fig. 11) buvo išskirtas ir XbaI galai pakeisti į Sall saitus DNR polimerazės I Klenovo fragmento pagalba ir prijungti Sall linkeriai. Šis 10,6 kb ilgio Sall fragmentas buvo klonuojamas į Sall saitą plazmidėje pRSVCATNEOTSHB3 (Fig. 12). Plazmidė turinti sąvyje teisingos orientacijos intarpą buvo indentifikuota ir pavadinta pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI (Fig. 13). Vėliau plazmidė buvo atiduota saugojimui Amerikos kultūrų kolekcijai, Rockville, MD, suteikiant jai saugojimo numerį ATCC 40933. Ji buvo pervadinta į pHRTSH. Šis atidavimas saugojimui buvo atliktas pagal visus Budapešto sutarties reikalavimus.

LĄSTELIŲ LINIJA

GH₃ ląstelės yra subklonuota MtT/W5 populiacija, kuri buvo gauta iš radiacija indukuoto žiurkių hipofizio auglio (B.K. Takemoto, Cancer research, 22:917, 1962) ir adaptuotos augimui kultūroje Tashjian et al., Endocrinology, 82:342-352, 1968. GH₃ ląstelės buvo paimtos iš Amerikos kultūrų kolekcijos ląstelių banko ir auginamos šios sudėties terpėje: Dulbecco modifikuota Eagle terpė (DMEM) + 15% Arklio serumo (HS) + 2,5% embrioninio veršiukų serumo (FBS) + 1% L-gliutamino (GH₃ terpė) 37^o C temperatūroje, esant 5% CO₂ koncentracijai.

DNR PARUOŠIMAS

Didelio kiekio plazmidės DNR išskyrimas

Plazmidės, kurios naudojamos stabilioms transfekcijoms, valomos šarminio lizavimo būdu. Šis būdas aprašytas Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, pp 1.7.1 -1.7.2. Išskirta šarminio lizavimo būdu DNR papildomai buvo valoma cezio chlorido gradientu. Šis valymo būdas aprašytas Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, pp 1.7.5 -1.7.7.

Prieš transfekciją HR vektoriai buvo apdorojami arba AatII arba ApaI. ApaI buvo naudojama plazmidės pRSVCATNEO linerizavimui ir AatII - HR plazmidės pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI linerizavimui. AatII ir ApaI skėlimo saitai pavaizduoti atitinkamai Fig. 10 ir 13. Po kirpimo tikamais restrikcijos fermentais, reakcijos mišinys ekstrahuojamas fenolio-chloroformo mišiniu, ekstrahuojamas chloroformu, išsodinama etilo alkoholiu ir kartą praplaunamas 70% etanoliumi. Plazmidės suspenduojamos steriliame dejonizuotame vandenyje (dH_2O) taip, kad koncentracija būtų lygi 1 mikrogramui/ mikrolitre ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), nustatant absorbcija OD_{260} . Tam kad padidinti transfekcijos efektyvumą ir/ arba padidinti homologinės rekombinacijos santykį su atsitiktine integracija, pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI buvo apdorojama ApaI. ApaI iškerpa tris atskirus saitus plazmidėje pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI ir pašalina visus vektorius, išskyrus reikalingus homologinei rekombinacijai (Fig. 13). Po apdorojimo ApaI, reakcijos mišinys elektroforezuojamas 0.8 % agarozės gėlyje ir, viršutinė juosta atitinka 10922 bp ilgio fragmentui. Šis fragmentas susidedantis iš dviejų 5' flankuojančių TSH β geno regionų, RSV promotoriaus - NEO regiono ir TSH β geno - aktyvuojančio RSV promotoriaus buvo išskirtas iš gelio elektroliucijos pagalba dializės maišelyje. Elektroliuuota DNR toliau buvo valoma elutip minikolonėle (Schleicher and Schuell) pagal gamintojo standartinės rekomendacijos. DNR buvo eliuuojama nuo kolonos, išsodinama etanoliumi, praplaunama 70% etanoliumi ir suspenduojama iki koncentracijos - $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

STABILI TRANSFEKCIJA

Kalcio fosfato transfekcija

48 valandas prieš transfekciją 3×10^6 GH $_3$ ląstelių patalpinama į 10 centimetrų (cm) lėkšteles. Į kiekvieną lėkštelę įdedama po 0.5 mililitro (ml) transfekcijos buferio, kuriame yra 10 μg DNR vektoriaus su 30 μg ultragarsu apdorotos lašišų spermos DNR. Transfekcijos buferis paruošiamas iš 4 g NaCl, 0,185 g KCl, 0,05 g Na $_2$ PO $_4$, 0.5 g dekstrozės, 2,5 g HEPES, tūris privedamas iki 500 ml, pH privedamas iki 7,5. 31 μl 2 moliarinio (M) CaCl $_2$ tirpalo pridedama į 0.5 ml DNR + transfekcijos buferį ir išmaišoma. Šis tirpalas gali būti saugomas 45 minutes kambario temperatūroje. Kai paruošiamas DNR - CaCl $_2$ - transfekcijos buferis, GH $_3$ terpė nupilama nuo GH $_3$ ląstelių ir DNR - CaCl $_2$ - transfekcijos buferis užsluoksniuojamas ant ląstelių. Ląstelės paliekamos kambario temperatūroje 20 minučių. Po 20 minučių pripilama 5 ml GH $_3$ terpės ir lėkštelės inkubuojamos 6 valandas 37 $^{\circ}$ C temperatūroje. Nuo ląstelių pašalinama terpė ir pridedama 3,5 minutėms 5 ml šviežio transfekcijos buferio, į kurį įdedama 15 % glicerino. Ląstelės du kartus praplaunamos su PBS, užpilama 10 ml GH $_3$ terpės. Po 48 valandų transfekcijos, terpė nupilama ir užpilama GH $_3$ terpė, kurioje yra 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418.

Elektroporacija

Elektroporacija vykdoma naudojant BTX 300 Transfektorių su 3,5 milimetru (mm) tarpais tarp elektrodų. 1×10^7 GH₃ ląstelių logaritminėje augimo fazėje nuimamos nuo lėkštelių tripsinizacijos pagalba, surenkamos centrifūguojant ir praplaunamos kartą su PBS. Ląstelės suspenduojamos 1,0 ml PBS ir supilamos į 2,9 ml talpos vienkartinės Ultra-UV kiuvetes (American Scientific products), kurios laikomos lede. Į ląsteles pridedama 10 µg DNR, sumaišoma ir išlaikoma 5 minutes ant ledo. Po 5 minučių elektrodai įkišami į kamerą, ląstelės elektroporuojamos, esant 750 mikrofaramams su 200 voltų pulsacija. Kiuvetė 10 minučių grąžinama atgal ant ledo. Ląstelės išimamos iš kiuvetės, pernešamos į konusinius 15 ml mėgintuvėlius su 9 ml GH₃ terpės, kurioje yra 1 % penicilino ir 1 % streptomicino, ir paliekama 10 minučių kambario temperatūroje. 1×10^7 elektroporuotų ląstelių pernešama į tris 10 cm skersmens lėkšteles, kiekvienoje lėkštelėje gaunama apytikriai po 3×10^6 ląstelių. Po 48 valandų pridedama GH₃ terpė, kurioje yra 400 µg/ml G418.

GH₃ ląstelių transfekcija su pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI (kirpimas su AatII), pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI (kirpimas su ApaI) ir pRSVCATNEO (kirpimas su ApaI).

pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI (kirpimas su AatII), pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI (kirpimas su ApaI) ir pRSVCATNEO (kirpimas su ApaI) plazmidės transfekuojamos į GH₃ ląsteles be DNR kontrolės proceso metu, naudojant kaip kalcio fosfatinį taip ir elektroporacijos metodus. Praėjus 48 valandoms po transfekcijos, ląstelės selekcionuojamos terpėje su G418. Maždaug po 14 - 21 dienos ląstelių kolonijos tampa matomos akimi, suskaičiuojamos kolonijos. Tais atvejais, kai nebuvo įvestos plazmidės, kolonijos nesusidaro, tai įrodo, kad selekcija vykdoma su G418 efektyvi ir kad tam būtina plazmidė, turinti RSV-NEO regioną, tam kad ląstelės turėtų atsparumą G418. Kolonijos nuimamos ir surekamos 17 mm skersmens klonavimo žiedo pagalba. Jei susidaro lėkštelėje daug kolonijų - nuo 10 iki 70 tai galima ląsteles surinkti tripsinizacijos pagalba. Tripsinizuotos kolonijos pernešamos į 6 šulinėlių lėkšteles ir paliekamos augti GH₃ terpėje su G418. Pasiekus 70 % - 80% paviršiaus užpildymą, po 80000 ląstelių pernešama į 24 šulinėlių lėkšteles ir užšaldoma tam, kad išsaugoti ląsteles vėlesniems tyrimams. 24 šulinėlių lėkštelėse ląstelės auginamos, kol užpildomas paviršius 50% -70%. Bendra RNR išskiriama iš GH₃ ląstelių pagal žemiau aprašomą metodą.

RNR IŠSKYRIMAS IŠ TRASFEKUOTŲ GH₃ LĄSTELIŲ, AUGINANT JAS 24 ŠULINĖLIŲ LĖKŠTELĖSE.

Toliau aprašoma metodo, kuris aprašytas Choczynski ir Sacchi, Anal. Biochem., 162:156-159, 1987, modifikavimas. Terpė, į kurą pernešamos GH₃ ląstelės 24 šulinėlių lėkštelėse, pašalinama ir ląstelės praplaunamos 1 ml PBS. Pripilama 1 ml GTC tirpalo ir ląstelės inkubuojamos kambario temperatūroje 5 minutes. GTC tirpalas gaminamas ištirpinant 250 g guanidintiociano (Fluka) 293 ml dH₂O, pridedant 17,6 ml 0,75 M natrio citratotirpalo, kurio pH 7,0, 10% sarkosilo (L-laurilsarkosilas). Prieš pat naudojimą 50 ml GTC tirpalą įpilama 360 µl β-merkaptoetanolio. Išlaikius 5 minutes kambario temperatūroje, 1 ml GTC-ląstelių lizato pernešama į Sarstedt 55.518 mėgintuvėlius, kuriuose yra 2 ml GTC tirpalo. Į kiekvieną mėgintuvėlį pripilama po 300 µl 2 M natrio acetato tirpalo, kurio pH 4,0 ir išmaišoma. Po to įpilama 3 ml dH₂O prisotinto fenolio ir vėl išmaišoma. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 600 µl chloroformo ir izoamilio alkoholio mišinio, santykiu 49:1, mėgintuvėliai rankomis purtomi 10 sekundžių ir paliekami ant ledo 15 minučių. Po to centrifuguojama 20 minučių Sorval RC-5B centrifūga su rotoriumi SM24, kai rotorius apsisukimai - 8000 apsisukimų per minutę (RPM) ir temperatūra palaikoma 4° C. Vandens fazė nupilama į naują Sarstedt mėgintuvėlį, kuriame yra 3 ml izopropanolio ir išlaikoma -20° C temperatūroje. Po valandos centrifuguojama 20 minučių Sorval RC-5B centrifūga su rotoriumi SM24, rotorius apsisukimai - 8000 RPM ir temperatūra palaikoma 4° C. Supernatantas nupilamas, nuosėdos suspenduojamos 500 µl GTC tirpalo. Suspenduota RNR pernešama į 1,5 ml talpos ependorfą, kuriame yra 500 µl izopropanolio. Mėgintuvėliai vėl išlaikomi valandą -20° C temperatūroje. Po to nucentrifuguojama per 5 minutes mikrocentrifūgoje, supernatantas nupilamas. Nuosėdos du kartus praplaunamos 70 % etanolio tirpalu tam, kad būtų galima pilnai nugarinti etanolį. Nuosėdos suspenduojamos 20 l vandeniniame dietilpirokarbonate (depc) ir kaitinama 65° C temperatūroje 5 minutes. Tokia RNR buvo naudojama kDNR sitezei, būtais aprašytais žemiau.

kDNR REAKCIJOS

1 Būdas

Pirmos kDNR spiralės sintezė vykdoma iš 2,5-6.0 mikrolitrų bendros RNR (apytiksliai 0,5-6 mikrogramai) reakcijos mišinyje, kurio tūris 10-20 mikrolitrai. Bendra RNR gaunama aukščiau aprašytu ekstrakcijos metodu, 5-10 minutes denatūruojama 70° C temperatūroje ir po to greitai atšaldoma ant ledo prieš įdedant reakcijos komponentus. Reakcijos sąlygos: 50 milimolių (mM) Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM MgCl₂, 10mM DTT, dCTP, dATP, dTTP kiekvieno po 0,5 mM (Pharmacia), 40 mM KCl, 500 vienetų/ml RNasino (Promega Biotech), 85 µg/ml oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Collaborative Research, Inc.), ir 15000-20000 vienetų/ml pelių

Moleney leukemijos viruso atvirkštinės transkriptazės (Bethesda research Laboratories), inkubacija vykdoma 37^o C temperatūroje 60 minučių. Reakcija sustabdoma pridėjus 40 mM EDTA, nukleino rūgštys išsodinamos pridedant natrio acetato iki 0,3 M koncentracijos ir du reakcijos mišinio tūrius etanolio. Nuosėdoms leidžiama subręsti 30 minučių ir jos nusodinamos trisdešimt minučių centrifūguojant mirocentrifūgoje, esant 14 000 rpm apsisukimams. Nuosėdos praplaunamos 70% etanoliu, išdžiovinamos ir suspenduojamos 15-25 ml vandeninio depc.

2 Būdas

Pirmos kDNR spiralės sintezės iš RNR sąlygos buvo adaptuotos, palyginus su aprašytu būdu Carol A. Brenner et al, BioTechniques, Vol. No. 10, pp. 1096-1103, 1989. Prie 1 µl bendros RNR paimtos po išsodinimo operacijos, kuri aprašoma aukščiau, pridedama iki 9 µl reakcijos buferio 0,5 ml tūrio ependorfe. Reakcijos buferio sudėtis: 200 vienetų pelių Moleney leukemijos viruso atvirkštinės transkriptazės (MMLVRT Bethesda Research Labs) ir sekantys reaktyvai, kurių galutinė koncentracija: 70 mM Tris-HCl pH 8,8, 40 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM kiekvieno dNTP, 4 mM MgCl₂ ir 0,45 OD₂₆₀ vienetų atsitiktinių heksamerų (Pharmacia). Po sumaišymo mėgintuvėliai 10 minučių inkubuojami kambario temperatūroje ir po to išlaikomi 42^o C temperatūroje vieną valandą. Po valandos mėgintuvėliai pakaitinami 90^o C temperatūroje 1 minutę, tam kad deaktyvuotųsi MMLVRT.

LĄSTELIŲ GH₃ RNR AMPLIFIKACIJA POLIMERAZINĖS GRANDININĖS REKCIJOS (PGR) PAGALBA

Geno TSH β kDNR sitetinama PGR amplifikacijos pagalba iš RNR transkriptų, kurie gaunami GH₃ ląstelių pagalba, kaip HR plazmidės aktyvavimo homologine rekombinacija rezultatas endogeniniame gene TSH β , naudojant sekančius pradmenis.

pradmuo	5'	3'
TSH β 5	AGTATATGATGTACGTGGACAGG	
TSH β 3	CACTTGCCACACTTGCAGCTCAGG	

Fig.14 nurodyti TSH geno regionai, kuriuos atitinka kiekvienas pradmuo.

PGR REAKCIJOS SĄLYGOS

Visos PGR reakcijos buvo vykdomos Ericomp Twinblock termocikleryje. Jei kDNR buvo sitetinama PGR amplifikacija pagal 2 metodą, tai papildomai 40 μ l buvo pridedama reakcijos mišinio prie 10 μ l, kDNR sitežė vykdoma 50 μ l tūryje. Galutinė reaktyvų koncentracija 50 μ l tūryje yra: 70 mM Tris-HCl pH 8,8, 40 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 2,25 vienetai Tag polimerazės (Pharmacia), po 0,2 mikromolių (μ M) kiekvieno pradmes, 200 μ l kiekvieno dNTP ir 0,8 mM MgCl₂.

Jei kDNR buvo sitetinama PGR amplifikacija pagal 1 metodą, aprašytą aukščiau, tai nuo 5 iki 10 μ l suspenduotos kDNR įdedama į nuo 40 iki 45 μ l tirpalą, kuriame galutinės reaktyvų koncentracijos yra: 70 mM Tris-HCl pH 8,8, 40 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 2,25 vienetai Tag polimerazės, po 0,2 μ M kiekvieno pradmes, po 200 μ l kiekvieno dNTP ir 0,8 mM MgCl₂.

Reakcijos buvo vykdomos sekančiu režimu.

1 minutė 94^o C temperatūroje

30 sekundžių 55^o C temperatūroje

2 minutes 72^o C temperatūroje

Šie ciklai buvo kartojami 30 - 40 kartų. 10 μ l kiekvieno reakcijos mišinio buvo tirama elektroforezės pagalba 6% poliakrilamidiniame gelyje, tam kad patikrinti ar yra 247 bp PGR fragmentas, kurio buvimas parodo, kad teisingas TSH β geno iRNR splaisingas.

TSH GENO RNR IŠ GH₃ LĄSTELIŲ IR ŽIURKIŲ HIPOFIZIO BENDROS DNR PGR AMPLIFIKACIJOS REZULTATAI

Tam kad nustatyti ar GH₃ ląstelės normaliai sintetina TSH β geno RNR, buvo tiriamos PGR reakcijos pagalba, sąlygomis, kurios aprašytos aukščiau, kDNR iš netransfekuotų GH₃ ląstelių ir kDNR iš žiurkių hipofizio. Teisingas TSH β geno iRNR fragmetas buvo stebimas teigiamoje kontrolėje, žiurkių hipofizio

pavyzdžiuose, bet jo nebuvo bendroje RNR mėginyje iš GH_3 ląstelių net po 60 ciklų (duomenys nepateikiami).

TRANSFEKCIJOS REZULTATAI

G418 atsparios ląstelių kolonijos, esančios 10 cm skersmens lėkštelėse, buvo skaičiuojamos tarp 14 ir 21 dienos po G418 įdėjimo į terpę.

Transkripcijos metodas Kolonijų skaičius 10 cm skersmens lėkštelėse

	<u>pRSVCATNEO</u>	<u>pRSVCATNEOTSHB3-5XBAI</u>	
		<u>kirpimas ApaI</u>	<u>kirpimas Aat2</u>
Kalcio fosfato 1	48	13	29
Kalcio fosfato 2	--	21	58
Elektroporacija 1	--	1295	415
Elektroporacija 2	--	1051	723

Bendra RNR buvo išskirta iš ląstelių surinktų kolonijų iš 24 šulinėlių lėkštelių, taip kaip aprašyta aukščiau. Iš RNR buvo susintetinta kDNR ir panaudota PGR amplifikavimui. Teigiamų ląstelių, produkujančių TSH β geno iRNR, kolonijų skaičius buvo nustatomas pagal 247 bp fragmentą elektroforezės pagalba poliakrilamidiniame gelyje. Kiekvieno eksperimento metu surinktų ląstelių kolonijų skaičius buvo nuo 10 iki 70 kolonijų. Ląstelių kolonijų skaičius po transfekcijos buvo artimas skaičiui atsparių G418 GH_3 ląstelių, kuriose TSH β genas buvo transkriptiškai aktyvuotas, klonų. Jei surinktos ląstelės nutestuojamos ir yra teigiamos, tai daroma prielaida, kad šios ląstelės yra kaip vienas klonas, esantis šiose surinktose ląstelėse.

<u>plazmidė</u>	<u>G418 atsparios kolonijos</u>	<u>pozityvios TSHβ RNR</u>
pRSVCATNEO	60	0
pRSVCATNEOTSHB3-XBAI (Aat2 kirpimas)	4942	3
pRSVCATNEOTSHB3-XBAI (Apa1 kirpimas)	8580	6

Šie rezultatai demonstruoja normaliai transkriptiškai inertiško TSH β geno sėkmingą aktyvaciją, naudojant šiame išradime pateiktą metodą. Nors kolonijų, traskribuojančių TSH β geną, skaičius yra nedidelis palyginus su kolonijomis,

kurios atsparios G418 (apytikriai viena vienam tūkstančiui atsparių kolonijų), šis rezultatas pagrinde sutampa su kitų homologinių rekombinacijų gautais rezultatais, (Michael Krieger, Gene transfer and Expression A Laboratory Manual, Stockton Press, New York, NY, 1990, pp. 56-60). Pastebėta, kad homologinės rekombinacijos greitis, matyt, proporcingas taikinio geno transkripcijos greičiui (M. Frohman and G. Martin, Cell, 56:145, 1989; S. L. Mansour et al, Nature, 336:348, 1988). Pažymėtina, kad pasiektas TSH β ekspresijos greitis yra dešimt kartų didesnis, nei atsitiktinės mutacijos atveju.

Tam kad įsitikinti, kad gauti rezultatai atsikartoja kiekvienamai surinktai kolonijai ir kad RNR transkripcija yra stabili, kolonijos pirma užšaldomos atskirai prieš pirmą testavimą ir tik po testavimo atšildomos ir padauginamos. Šviežiai atšildytos atrinktos GH₃ ląstelės užsėjamos į T 25 audinių kultūrų indus ir padauginamos iki 70% -80% indo paviršiaus padengimo. Po 80 000 ląstelių įdedama į 24 šulinėlių lėkštes ir auginamos iki 50% -80% šulinėlio paviršiaus padengimo. Ekstrahuojama RNR, pervedama į kDNR ir vėl tikrinamas TSH β geno RNR buvimas po PGR elektroforeze 6% poliakriamidiniame gelyje. Antro patikrinimo PGR reakcijos rezultatai pateikti Fig.15. Poliakrilamidinis gelis buvo ryškinamas etidio bromidu, tam kad fluorescuotų ultraviolete RNR fragmentai. Takeliuose 1, 2 ir 3 užnešti GH₃ ląstelių, kurios buvo transfekuojamos pRSVCATNEO pagalba, kDNR PGR reakcijos produktai. pRSVCATNEO neturi homologinių regionų su TSH β genu ir todėl nesugeba aktyvuoti TSH β geno homologinės rekombinacijos pagalba. Kaip galima matyti iš Fig.15, šiuose takeliuose nėra 247 bp juostos, tai įrodo, kad TSH β genas nėra aktyvuojamas. Takelyje 6 užnešta neigiama kontrolė. Šiame takelyje užnešti trys apjungti pavyzdžiai GH₃ ląstelių, kurios buvo transfekuojamos pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI pagalba (kerpant ApaI), bet kurios pirmos atrankos metu neturėjo TSH β geno transkripcijos. Kaip matoma, 6 takelyje nėra juostos, atitinkančios 247 bp ilgui, tai parodo, kad plazmidė pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI (kerpant ApaI) įvesta atsitiktinės integracijos pagalba į genomą, nesugeba produkuoti 247 bp ilgio TSH β geno fragmento, gaunamo PGR pagalba. Takeliuose 7, 8, 9 ir 10 užnešti atitinkamai 25 nanogramai, 100 nanogramų, 200 nanogramų ir 400 nanogramų kDNR susintetintos iš bendros žiurkių hipofizio RNR, produktai, gauti PGR reakcijos pagalba. Šiuose takeliuose esančios 247 bp ilgio juostos, produkuojamos iš kDNR, išskirtos iš žiurkių ląstelių, kurios normaliai ekspresuoja TSH β geną, parodo, kad PGR reakcijos sąlygos yra tinkamai optimizuotos ir kad gaunamos 4 ir 5 takelyje PGR juostos parodo, kad yra ekspresuojamas ir yra korektiško ilgio TSH β genas, gautas homologinės rekombinacijos pagalba. Dvi apjungtų ląstelių grupės, transfekuotos su pRSVCATNEOTSHB3-5XbaI (ApaI kirpimas), kurios buvo teigiamos pirmoje atrankoje, ApaI-107 užnešta 4 takelyje ir ApaI-136 užnešta 5 takelyje, papildomai

buvo testuojamos, ar turi aktyvuotą TSH β geną. Šio geno buvimą ir jo teisingumą įrodo juostos elektroforegramoje, gautos PBR reakcijos pagalba. Taip pat iš gautų rezultatų galima pasakyti, kad TSH β geno transkripcija yra stabiliai aktyvuota. 247 bp ilgio juostų, kurios gaunamos iš ApaI-107 ir ApaI-136 teigiamų klonų, buvimas 4 ir 5 takeliuose ir šių juostų nebuvimas neigiamoje kontrolėje GH₃ ląstelių, kurios buvo transfekuojamos pRSVCATNEO pagalba takeliuose 1 - 3 ir neigiamos kontrolės GH₃ ląstelių, kurios buvo transfekuojamos pRSVCATNEOTSMB3-5XbaI (ApaI kirpimas) pagalba takelyje 6, parodo, kad geno TSH β RNR neprodukuojama ląstelėse, kai RNR įjunginama homologinės rekombinacijos pagalba.

Pateikiamas išradimas neapsiriboja aprašytais ląstelėmis. Visos ląstelės turi genetinę informaciją, kuri normaliai būna tyli arba inertiška. Dauguma jų sugeba ekspresuoti tik kai kuriuos genus. Nors bet kurių ląstelių linijos normaliai transkriptiškai tylūs ar inertinius genus galima aktyvuoti, kad genas ekspresuotų produktą pagal šį išradimą ir bet kurio genomo geno ekspresijos charakteristikas galima modifikuoti pagal šį išradimą. Net ir prieš tai transformuotas ląstelių linijos gali būti naudojamos taip ilgai, kol pirmoji transformacija nesuardys interesuojamo geno. Ląstelių linijų šaltinis nėra svarbus. Ląstelių linijos gali būti gyvūnų arba augalų, pirminės, nenutrūkstamai kultivuojamos arba immortalizuotos. Žinoma, svarbu, kad ląstelės būtų stabilios ir imortalizuotos, nes po apdorojimo šio išradimo metodo pagalba, ekspresija gali būti komercializuota. Klonuotiems mikroorganizmams, kaip prokariotams taip ir eukariotams, gali būti taikomas šis išradimo metodas.

Nors šis metodas išradime naudojamas normaliai transkriptiškai tylių arba inertiškų genų ekspresijai, jis gali būti pritaikytas ir genų, kurie yra natūraliai ekspresuojami šeimininko ląstelėse, ekspresijos charakteristikų modifikavimui. Pavyzdžiui, jei reikalinga pritaikyti geno ekspresiją priklausomai nuo kultivavimo sąlygų, arba kad ekspresija būtų valdoma, tinkamas reguliatorinis DNR segmentas, toks kaip reguliuojamas promotorius, gali būti įterptas, kuris pakeis tokias charakteristikas, kaip represija arba indukcija. Pavyzdžiui, jei žinoma, kad ląstelės tipas turi branduolio steroidų receptorių, tokius kaip estrogeno, testosterono ar gliukokortikoido ar tiroksino receptorių, tai įgalina naudoti F segmentu steroido ar tiroksino elementus. Kaip atsparumo elementas gali bet kuri DNR, kuri suriša tokius receptorių tam kad įgytų santykinį atsparumą transkripcijos metu. Jei net natūraliai ląstelės nėra atsparios gliukokortikoidams, pavyzdžiui, DNR fragmentas, kuris koduoja gliukokortikoido receptorių, gali būti įterptas į konstrukciją, arba kitu būdu į įterptas į genomą, ko pasekoje gaunamos ląstelės atsparios gliukokortikoidams. Reguliacinio promotoriaus gali būti naudojamas tuo atveju, kai interesuojamas genas normaliai yra silpnai transkribuojamas. Kiti reguliavimo

būdai gali būti gauti įterpiant tinkamą DNR reguliacinį segmentą norimoje vietoje šio išradimo pagalba.

Tokiu būdu, šiame išradime aprašytu metodu galima ne tik stimuliuoti normaliai transkriptiškai tylūs genus, bet platesne prasme šis būdas gali būti pritaikytas ir bet kokio endogeninio šeimnininko ląstelių linijos geno ekspresijos modifikavimui.

Specifinis homologinės rekombinacijos metodas nėra iš esmės šio išradimo naujumas. Tokie metodai žinomi, jų pagalba šiame išradime taikinio reguliacinė DNR seka įvedama į norimą vietą, tam kad aktyvuoti interesuojamą geną. Nors šio metodo pagalba, naudojant linearizuotas konstrukcijas su dviem homologiniais regionais, kur bet kuris iš galų gali būti įterptas, bet koks kitas metodas, kurio pagalba galima tai atlikti, pavyzdžiui, naudojant žiedines konstrukcijas, gali būti naudojamas šiame išradime. Šio išradimo ypatybė yra homologinės rekombinacijos panaudojimas DNR reguliacinės sekos įvedimui, kurios pagalba modifikuojamos ląstelių linijos arba mikroorganizmų ekspresijos charakteristikos, kontroliuojamai sujungiant ją su genu, kuris pagrinde yra normaliai transkripciškai tylus ar inertiškas, ląstelės linijos genome, arba amplifikuojančios sekos, be reguliacinės sekos, įterpimui pakankamai arti geno ląstelės linijos genomo, kuris tampa transkribuojamu dėka amplifikuojančios sekos. Nėra būtina, kad būtų įterptas selekcijos markeris. Atranka gali būti vykdoma tik sekant interesuojamą geno produktą, arba iRNR terpėje arba ląstelėse po DNR konstrukcijos įterpimo. Be to, apibrėžtyje, kur įterpta reguliatorinė seka, amplifikacija, jei to norima, nėra būtina. Neigiamas selekcijos markeris palengvina ląstelių atranką, bet nėra būtinas sėkmingam šio išradimo panaudojimui. Tokiu būdu, išradimas reikalauja tik DNR reguliacinio segmento arba amplifikuojančio segmento, jei to reikia, įterpimo į specifinę vietą. Bet papildomas teigiamo ir (arba) neigiamo selekcijos markerio įvedimas ir papildoma geno amplifikacija, jei to pageidaujama, gali būti atliktas šiame metode, kai įvedamas reguliatorinis segmentas.

Terminas "ekspresijos modifikacija", naudojamas šio išradimo aprašyme ir apibrėžtyse, yra apibrėžiamas, kaip ekspresijos terminavimo pašalinimas, įterpiant homologinės rekombinacijos pagalba, mutacijos, delecijos, stop kodoną arba kitas nukleotidų sekas į interesuojamą geną, tam, kad išvengti interesuojamo produkto ekspresijos. Ankstesni darbai nurodo, kaip panaudoti homologinę rekombinaciją specifinių mutacijų įterpimui ir ląstelės produkto ekspresijos specifiškam nutraukimui (pavyzdžiui, Schwarzberg et al, PNAS (USA), 87:3210-3214, 1990). Šiame išradime šios procedūros nėra įtrauktos. Šiame išradime "ekspresijos modifikacija" atliekama, įterpiant reguliacinius ir/arba amplifikuojančius regionus į specifinę norimą vietą homologinės rekombinacijos pagalba. Šios modifikacijos yra aktyvuojančios ir/arba sustiprinančios interesuojamo produkto ekspresiją.

Visur, kur naudojama šiame aprašyme frazė DNR reguliacinis segmentas yra "veiksmingai surištas su" genu, tai reiškia, kad DNR reguliacinis segmentas įterptas taip, kad interesuojamo geno ekspresija reguliuojama šio DNR reguliacinio segmento. Reguliacinis segmentas paprastai būna 5'kryptimi, bet gali būti ir 3' kryptimi ar geno viduje, svarbu kad jis galėtų bet koku būdu reguliuoti geno ekspresiją. DNR reguliacinis segmentas gali būti promotorius, terminatorius, operatorius, sustiprintojas, geno tylėjimą sukeliantis, sulėtintojas ar panašūs, ar bet kokia jų kombinacija.

Visur terminai "prieš srovę" arba "pasroviui", kurie yra naudojami išradimo aprašyme ir apibrėžtyse, reiškia atitinkamai 5'-kryptį ar 3'-kryptį lyginant su interesuojamo geno koduojančia grandine. Šie, išradimo aprašyme naudojami, apibrėžimai pilnai atskleidžia metodą, kitur jie gali būti modifikuoti ir/arba adaptuoti įvairiuose pritaikymuose, nenukrypstant nuo pagrindinės koncepcijos. Ketinama apimti bet kuriuos pritaikymus ir modifikacijas, esančius terminų reikšmėse ir jų ekvivalentuose, kurie yra atskleisti išradime. Taip pat turi būti suprata, kad frazeologija ir terminologija naudojama apibrėžimui ir ne apribojimui.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Normaliai transkriptiškai tylaus geno ląstelių linijos genome aktyvavimo tam, kad nurodyta ląstelių linija galėtų ekspresuoti anksčiau minėto geno produktą, būdas besiskiriantis tuo, kad apima DNR konstrukcijos įterpimą į minėtą genomą homologinės rekombinacijos būdu, kai ta DNR konstrukcija turi veiksmingai prijungtą (DNR) reguliacinį segmentą, galintį stimuliuoti minėto geno ekspresiją ir (DNR) nukreipiantįjį segmentą, homologišką nurodyto geno sričiai, kurioje yra minėtas genas arba arčiausiai prie jo, ir minėta konstrukcija įterpta taip, kad tas reguliacinis segmentas yra veiksmingai prijungtas prie minėto dominančio geno.

2. Geno ląstelių linijos genome ekspresijos charakteristikų modifikavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima DNR konstrukcijos įterpimą į minėtą genomą homologinės rekombinacijos būdu, kai minėta DNR konstrukcija turi DNR reguliacinį segmentą, kuris tinkamai prijungtas, sugeba modifikuoti minėto geno ekspresijos charakteristikas, lyginant su jo esamu DNR reguliaciniu segmentu, ir DNR taikinio segmentą, homologišką minėto geno regionui ir esantį minėtame gene arba prie jo, kur ta konstrukcija yra įterpta taip, kad reguliacinis segmentas yra veiksmingai prijungtas prie dominančio geno.

3. Geno ląstelių linijos genome ekspresijos charakteristikų modifikavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima DNR konstrukcijos įterpimą į minėtą genomą homologinės rekombinacijos būdu, kai minėta DNR konstrukcija turi ekspresyvų, amplifikalų geną ir sugeba amplifikuoti minėtą geną, jei jis įterptas pakankamai arti, ir DNR taikinio segmentą, homologišką minėto geno regionui, esančiam minėto geno ribose arba arti prie jo, kur ta konstrukcija įterpta taip, kad minėtas amplifikalus genas, esantis pakankamai arti prie minėto dominančio geno, kad sukeltų jo amplifikaciją, kai minėtas amplifikalus genas yra amplifikuojamas.

4. Būdas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta DNR konstrukcija papildomai turi mažiausiai vieną ekspresyvų selektyvų markerinį geną, išsidėsčiusi taip, kad galėtų būti įterptas su minėtu ekspresyviu, amplifikuojančiu genu.

5. Būdas pagal 1, 2 arba 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta DNR konstrukcija turi du DNR taikinio segmentus, homologiškus minėto geno regionui ir esančius minėtame gene arba už jo, vienas iš minėtų taikinio segmentų yra 3' krypties lyginant su regulicinu segmentu, o kitas 5' krypties, lyginant su reguliaciniu segmentu.

6. Būdas pagal 1, 2 arba 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta DNR konstrukcija papildomai turi mažiausiai vieną ekspresyvų selektyvų markerinį geną, išsidėsčiusį taip, kad galėtų būti įterptas su minėtu reguliaciniu segmentu.

7. Būdas pagal 1, 2, 3, 4, 5, arba 6 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta DNR konstrukcija papildomai turi negatyvų selektyvų markerinį geną, išsidėsčiusį minėto taikinio segmento atžvilgiu taip, kad nebūtų įterptas, kada minėta konstrukcija yra tinkamai įterpta homologinės rekombinacijos būdu, ko pagalba negatyvus selektyvus markeris neekspresuojamas ląstelėse, kuriose ta DNR konstrukcija yra tinkamai įterpta.

8. Būdas pagal 1, 2, 5, 6 arba 7 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta DNR konstrukcija papildomai turi ekspresyvų amplifikalų geną, išsidėsčiusį taip, kad galėtų būti įterptas su minėtu reguliaciniu segmentu.

9. Būdas pagal 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 arba 8 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta ląstelių linija yra eukariotinių ląstelių linija.

10. Būdas pagal 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta ląstelių linija yra gyvulių ląstelių linija.

11. Būdas pagal 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta ląstelių linija yra žinduolių ląstelių linija.

12. Būdas pagal 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta ląstelių linija yra augalų ląstelių linija.

13. Būdas pagal 6 punktą ir papildomai sukeliant minėto geno produkto ekspresiją, besiskiriantis tuo, kad toliau apima pakopas, sekančias minėtus įterpimo žingsnius:

minėtų ląstelių linijų, kurios ekspresuoja minėto selektyvaus markerinio geno produktą, klonų atrinkimas;

atrinktų klonų kultivavimas pakankamomis sąlygomis, kuriose ekspresuotąsi minėto geno produktas; ir

minėto geno produkto surinkimas.

14. Būdas pagal 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas selektyvus markerinis genas yra neomicino atsparumo genas, ir minėta atrinkimo pakopa vyksta, atrenkant tuos neomicinui atsparius klonus.

15. Būdas pagal 13 arba 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta DNR konstrukcija papildomai turi negatyvų selektyvų markerinį geną, išsidėsčiusį taikinio segmento atžvilgiu taip, kad nebūtų įterpta, minėta konstrukcija yra tinkamai įterpta homologinės rekombinacijos būdu, ko pagalba tas negatyvus selektyvus markeris neekspresuojamas ląstelėse, kuriose minėta DNR konstrukcija yra tinkamai įterpta, ir minėta atrinkimo pakopa toliau apima tų klonų, kurie neekspresuoja minėto negatyvaus selektyvaus markerinio geno, atrinkimą.

16. Būdas pagal 15 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas negatyvus selektyvus markerinis genas yra *Herpes simplex* viruso timidinkinazės genas, ir minėtas selekcinis žingsnis apima selekciją tų klonų, kurie atlaiko veikimą terpės, užmušančios ląsteles, kurios ekspresuoja minėtą geną.

17. Ląstelių linijos genomas, turintis DNR reguliacinį segmentą, veiksmingai prijungtą prie natūraliai esančio geno inserciniame saite, kuris charakterizuojamas kaip predeterminuota DNR seka, besiskiriantis tuo, kad minėtas DNR reguliacinis segmentas minėtoje genomo vietoje natūraliai neegzistuoja.

18. Ląstelių linija, galinti ekspresuoti normaliai transkripciskai tylaus geno produktą minėtų ląstelių linijos genome besiskiriantis tuo, kad minėtas genomas, turi įterptą DNR reguliacinį segmentą, veiksmingai prijungtą prie minėto normaliai transkripciskai tylaus geno o minėtas DNR reguliacinis segmentas, sugeba pagreitinti minėtų ląstelių linijos geno produkto ekspresiją.

19. Ląstelių linija, kuriai būdinga sustiprinta geno produkto ekspresija, palyginus su ląstelių linija, iš kurios ji yra gauta, besiskirianti tuo, kad minėtas produktas yra endogeninio geno, esančio minėtos ląstelės genome, produktas, o minėtas genomas turi įterptus į jį, prie arba netoli minėto endogeninio geno, egzogeninės DNR reguliacinį segmentą ir/arba amplifikalų geną, sugebančius sustiprinti minėto geno produkto ekspresiją minėtoje ląstelių linijoje.

20. Ląstelių linija pagal 19 punktą, besiskirianti tuo, kad minėtas egzogeninės DNR reguliacinis segmentas ir (arba) amplifikacinis genas yra egzogeninės DNR reguliacinis segmentas.

21. Ląstelių linija pagal 19 punktą, besiskirianti tuo, kad minėtas egzogeninės DNR reguliacinis segmentas ir (arba) amplifikacinis genas yra egzogeninis amplifikacijos genas.

22. Ląstelių linija pagal 18 arba 20 punktą, besiskirianti tuo, kad minėtas DNR reguliacinis segmentas sugeba pagreitinti geno produkto, normaliai ekspresuojamo minėtoje ląstelių linijoje arba mikroorganizme, ekspresiją.

23. Ląstelių linija pagal 22 punktą, besiskirianti tuo, kad įterptas DNR reguliacinis segmentas yra dalis DNR konstrukcijos, turinčios minėtą DNR reguliacinį segmentą ir mažiausiai vieną selektyvų markerinį geną.

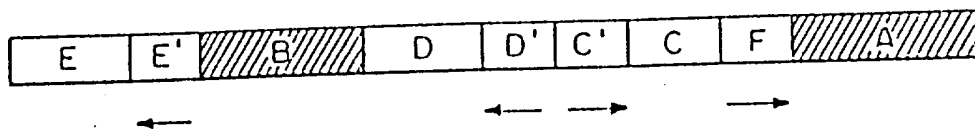
24. Ląstelių linija pagal 23 punktą, besiskirianti tuo, kad minėta DNR konstrukcija papildomai turi amplifikacinį geną.

25. Ląstelių linijos geno produkto gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima diferencijuotų ląstelių linijos, pagal bet kurį nuo 15 iki 24 punktą, kultivavimą tokiomis sąlygomis, kurios pagreitina minėto geno produkto ekspresiją ir kaupimąsi.

26. DNR konstrukcija, skirta įterpimui į predeterminuotą šeimininko ląstelių liniją, besiskirianti tuo, kad turi veiksmingai prijungtą DNR reguliacinį segmentą, galintį modifikuoti šeimininko ląstelių linijos genų ekspresijos charakteristikas, ir DNR taikinio segmentą, homologišką šeimininko ląstelių linijos genome esančio preselektyvuoto geno regionui.

27. DNR konstrukcija, skirta įterpimui į predeterminuotų šeimininko ląstelių liniją, besiskirianti tuo, kad turi įterptą pakankamai arti ekspresyvų amplifikacinį geną, galintį amplifikuoti šeimininko ląstelių linijos geną, ir DNR taikinio segmentą, homologišką šeimininko ląstelių linijos genome esančio preselektyvuoto geno regionui.

FIG. 1



ATSITIKTINĖ INTEGRACIJA

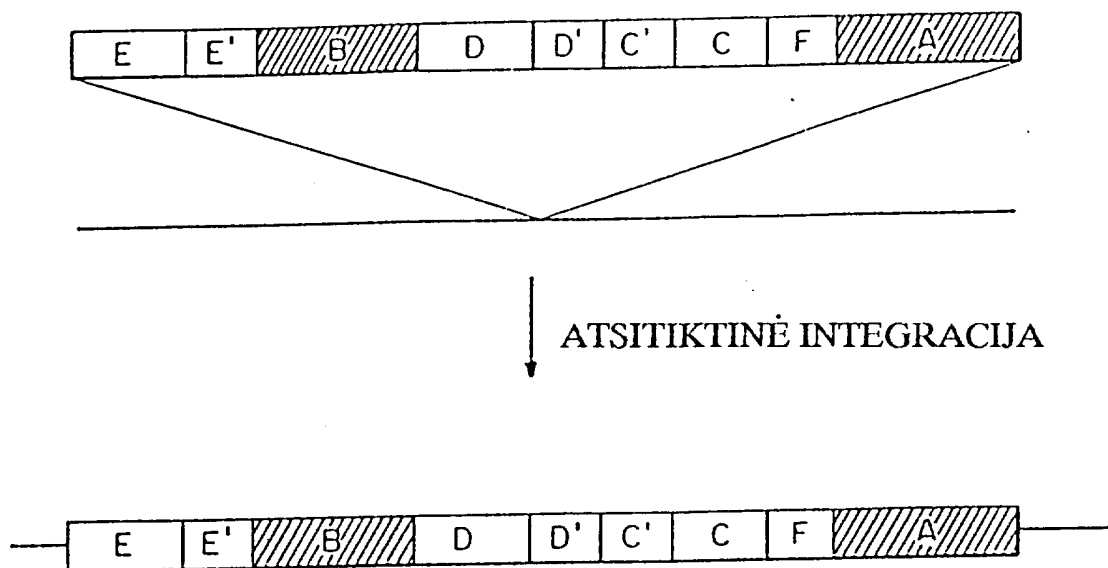
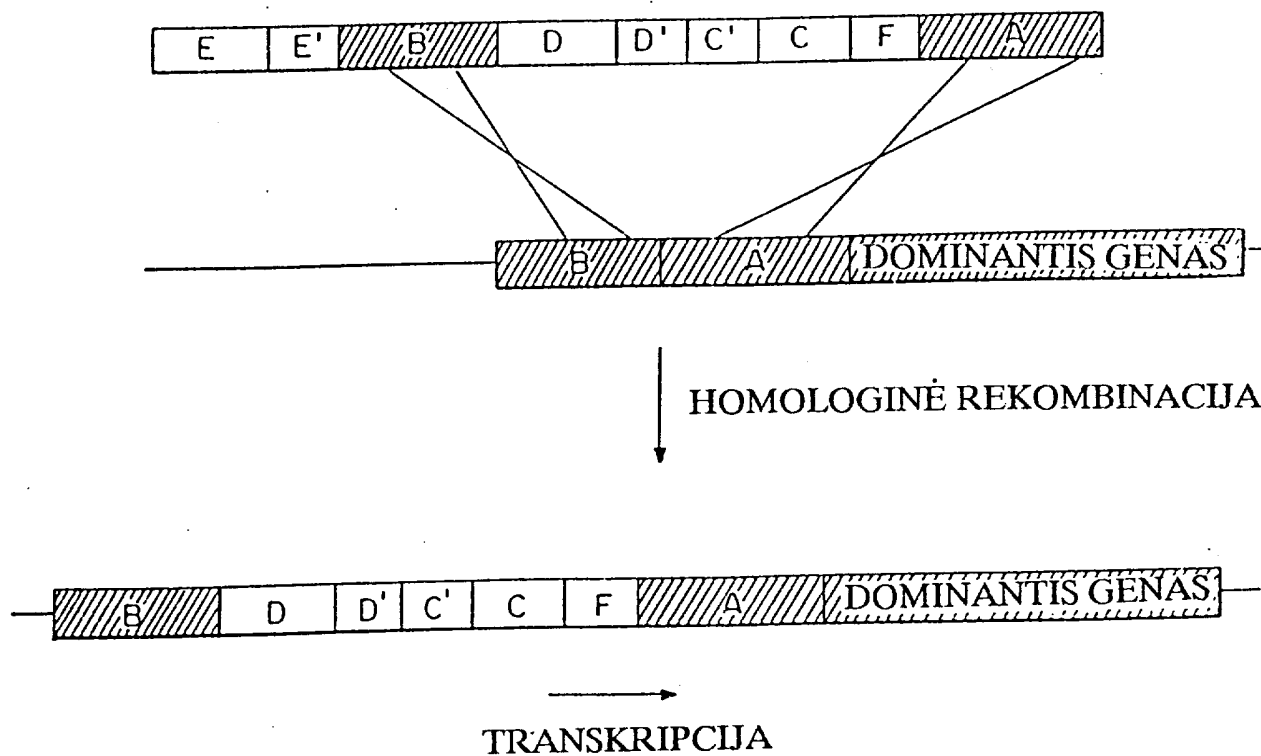


FIG. 2B

HOMOLOGINĖ REKOMBINACIJA

2



3 / 14
FIG. 3

ŽIURKĖS TSH BETA HOMOLOGINĖS REKOMBINACIJOS KONSTRUKCIJA

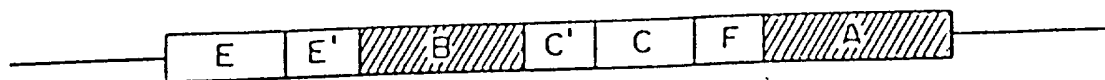


FIG. 4

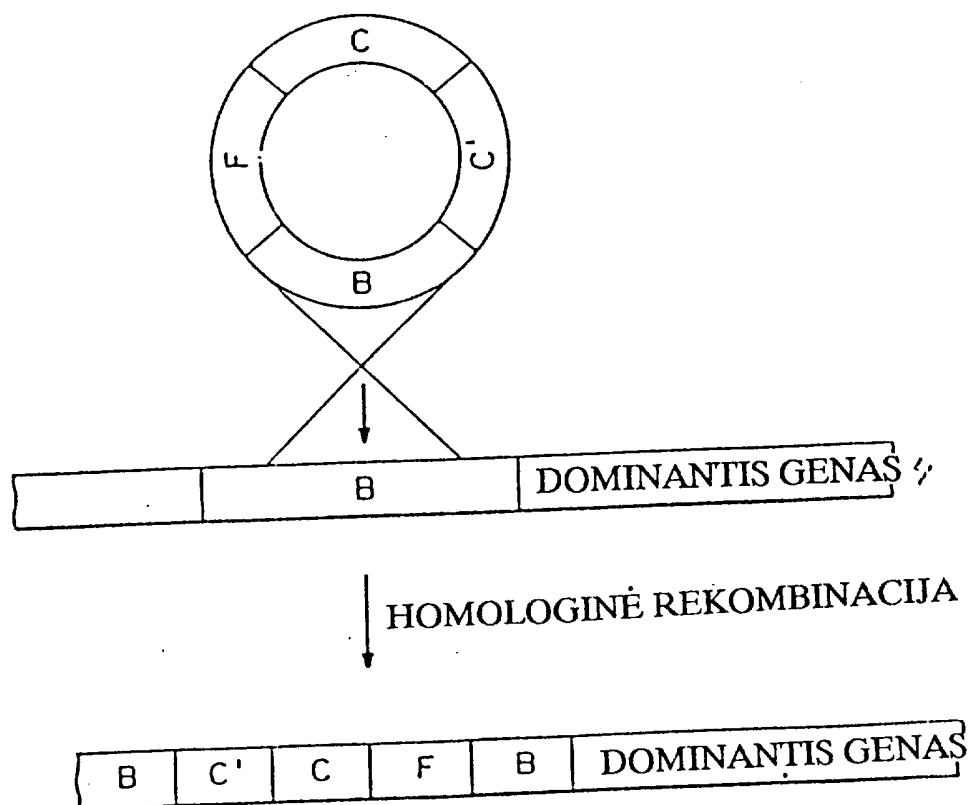
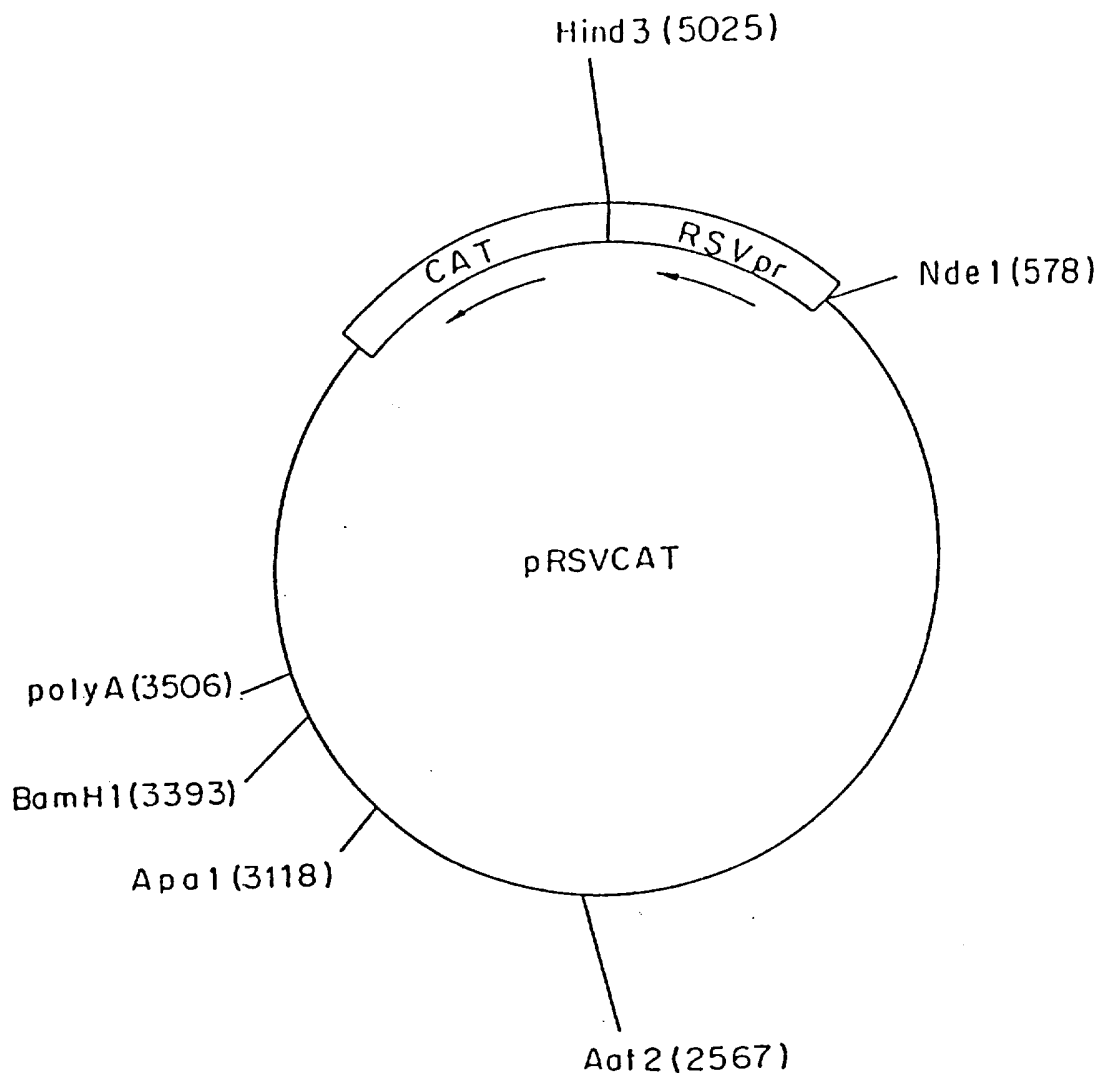


FIG. 5

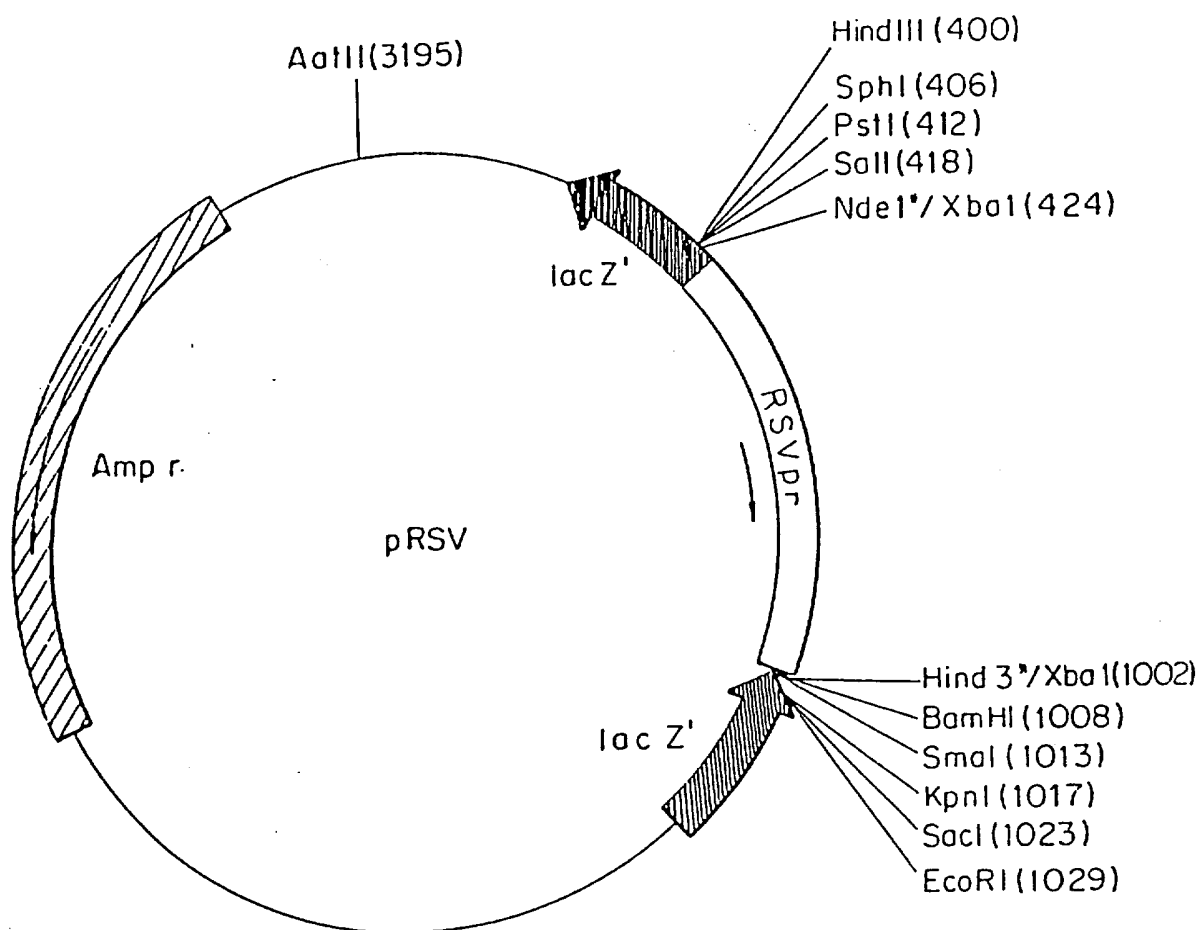


RODYKLĖ RODO GENO KRYPTĮ

6

— — — — —

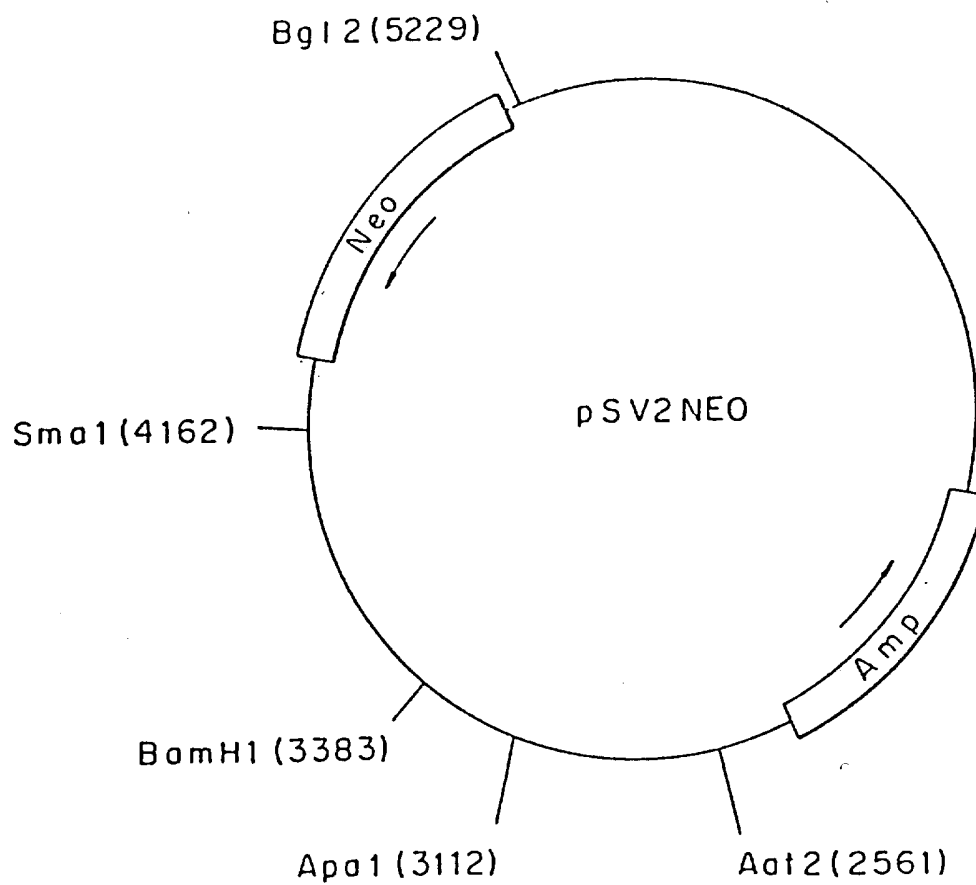
FIG. 6



SAITAS DAUGIAU NEEGZISTUOJA 7
 / RODYKLĖ RODO GENO KRYPTĮ 8



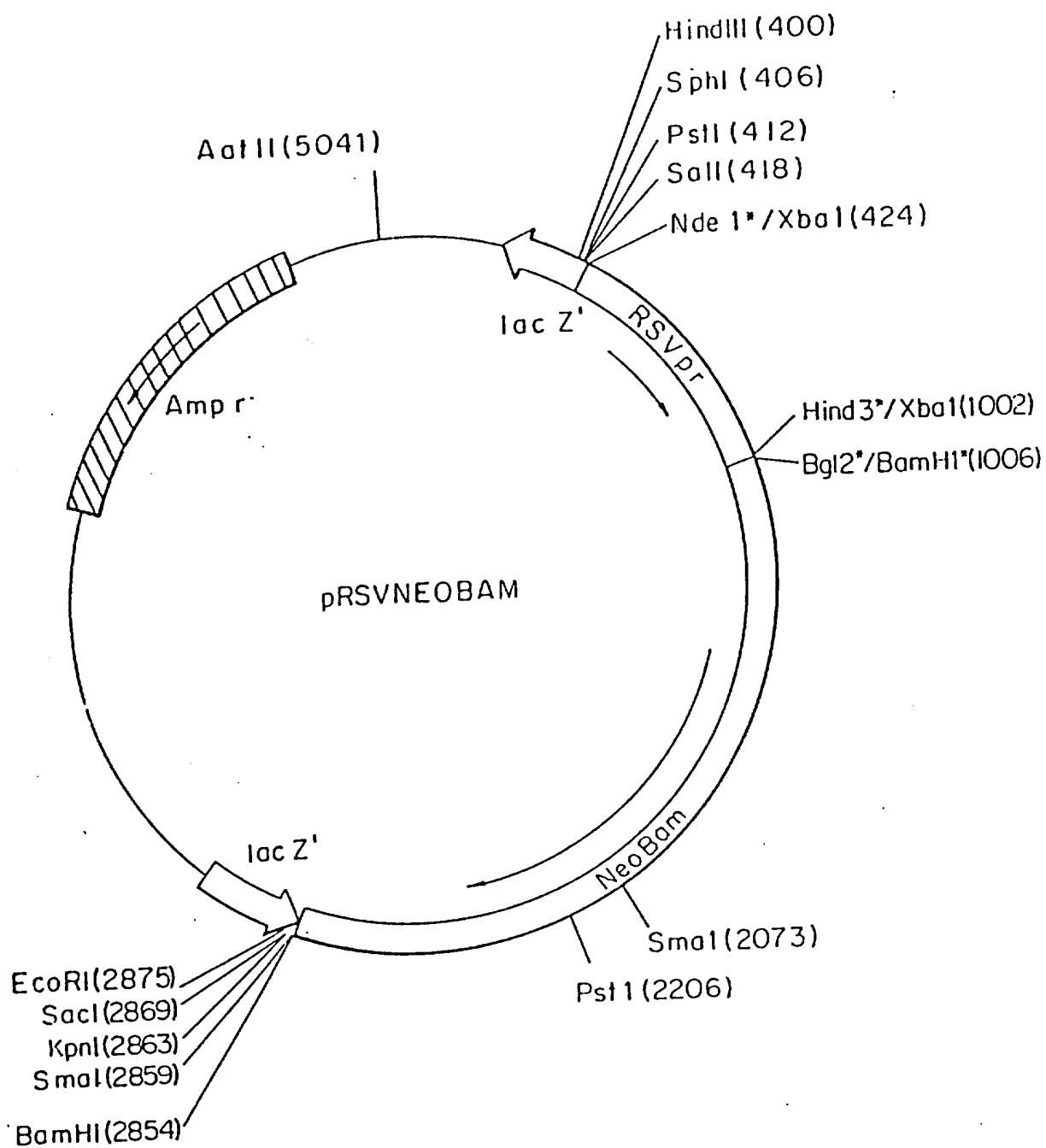
FIG. 7



RODYKLĖ RODO GENO KRYPTĮ

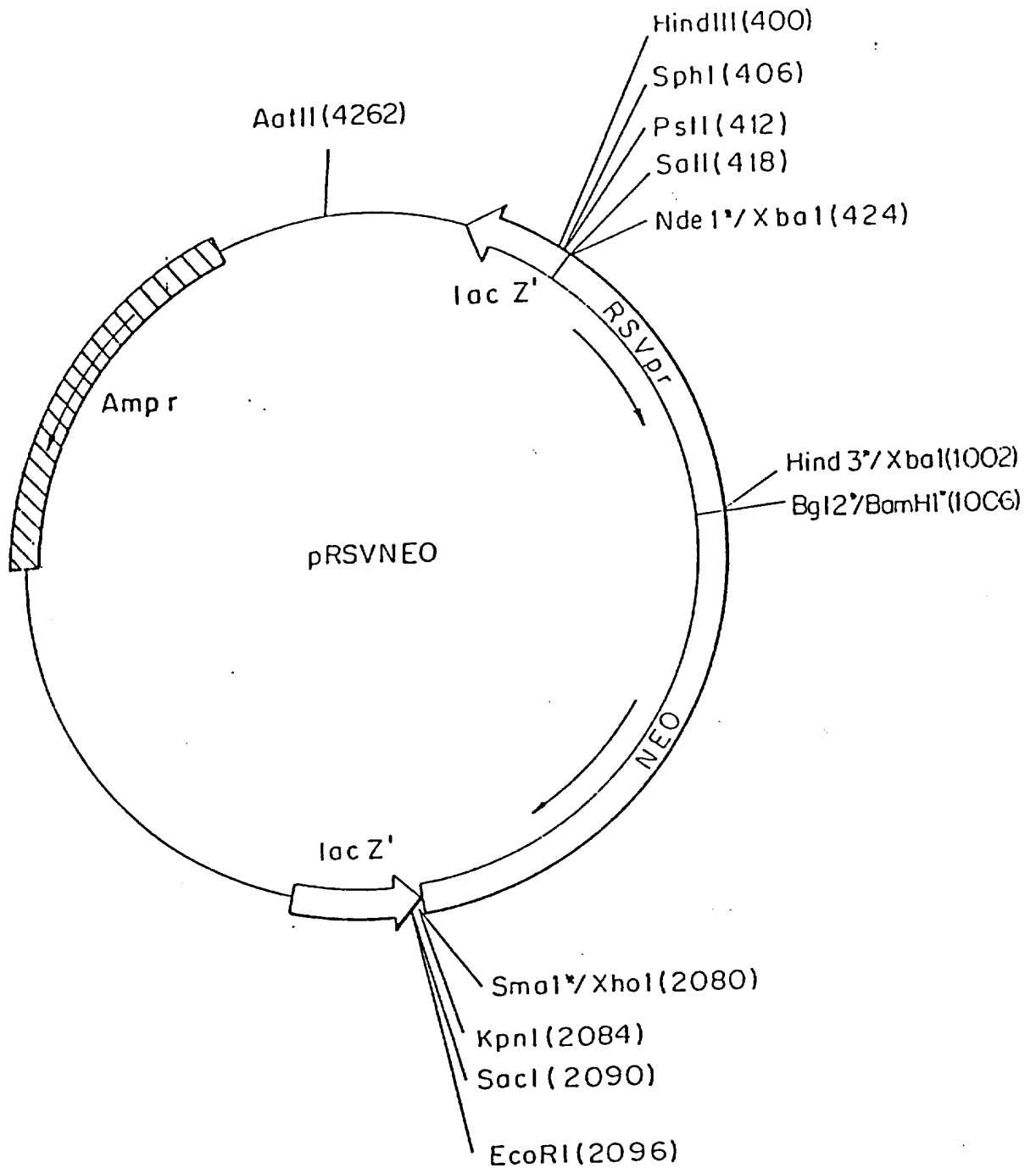
—

FIG. 8



SAITAS DAUGIAU NEEGZISTUOJA 10
 RODYKLĖ RODO GENO KRYPTĮ 11

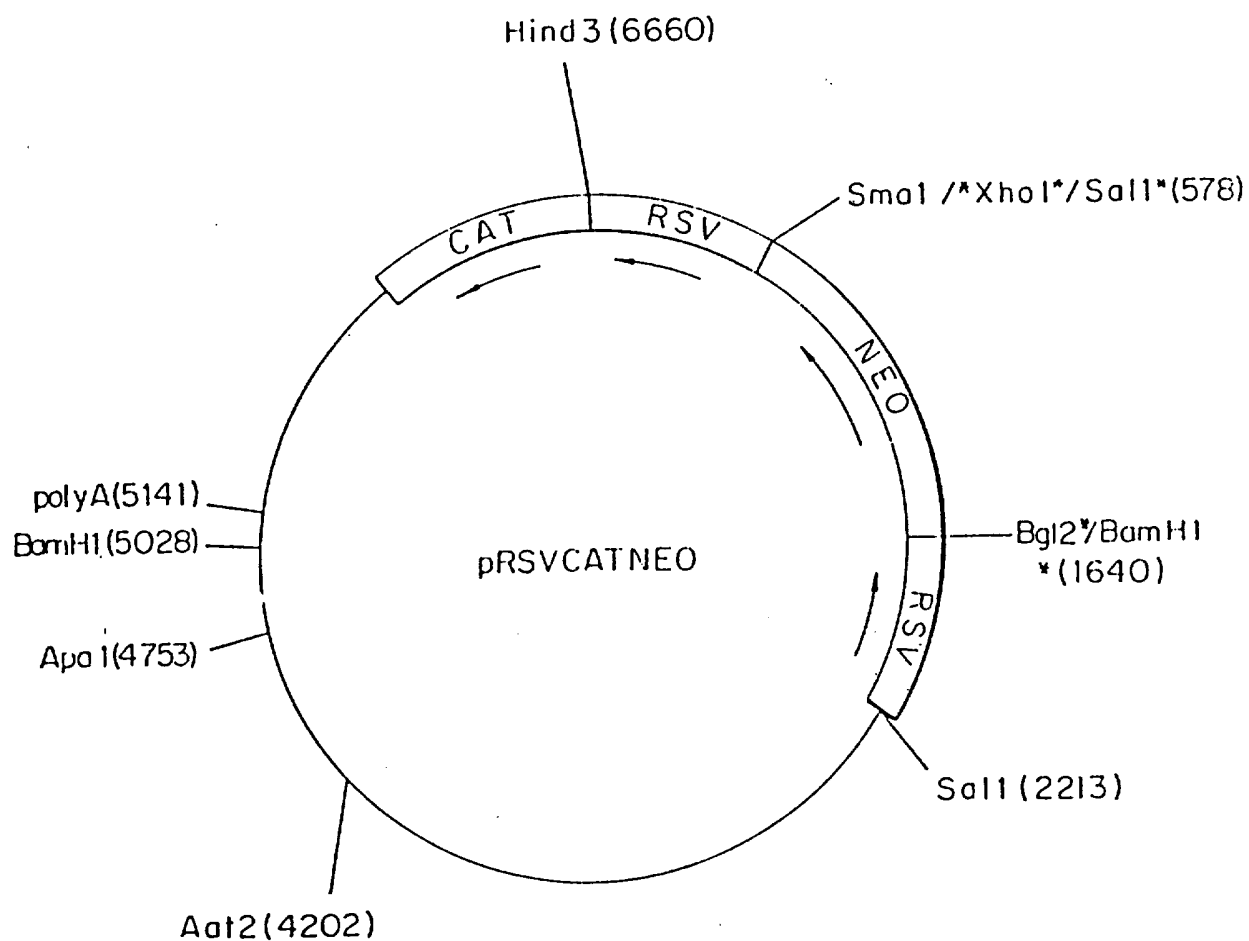
FIG. 9



SAITAS DAUGIAU NEEGZISTUOJA / 2
 RODYKLĖ RODO GENO KRYPTĮ / 3



FIG. 10



SAITAS DAUGIAU NEEGZISTUOJA
 RODYKLĖ RODO GENO KRYPTĮ

14

15



FIG. 11

ŽIURKĖS TSH BETA /b

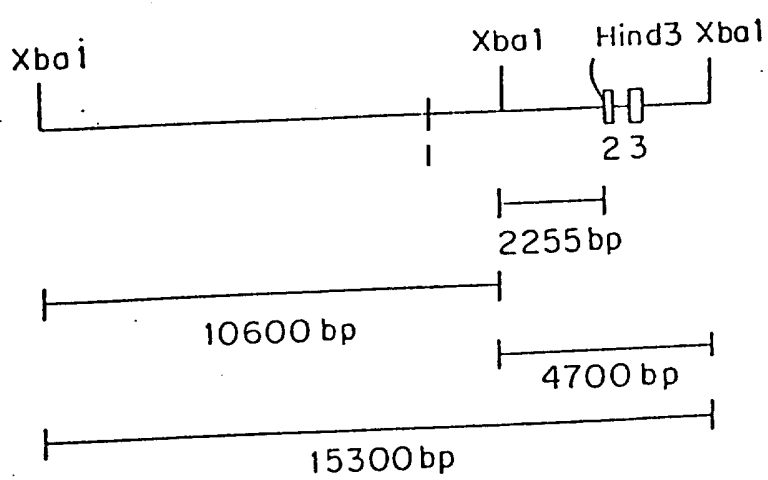
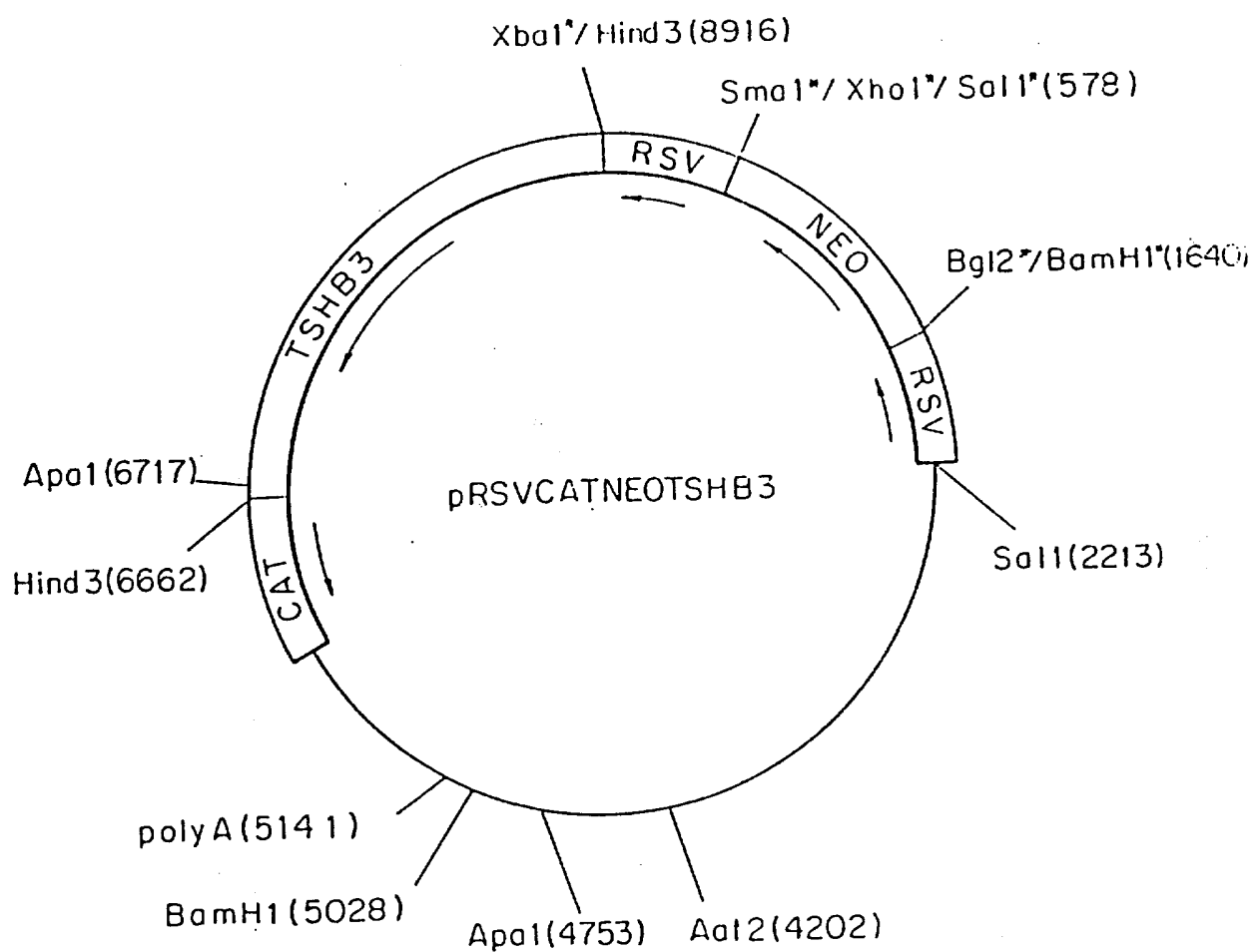


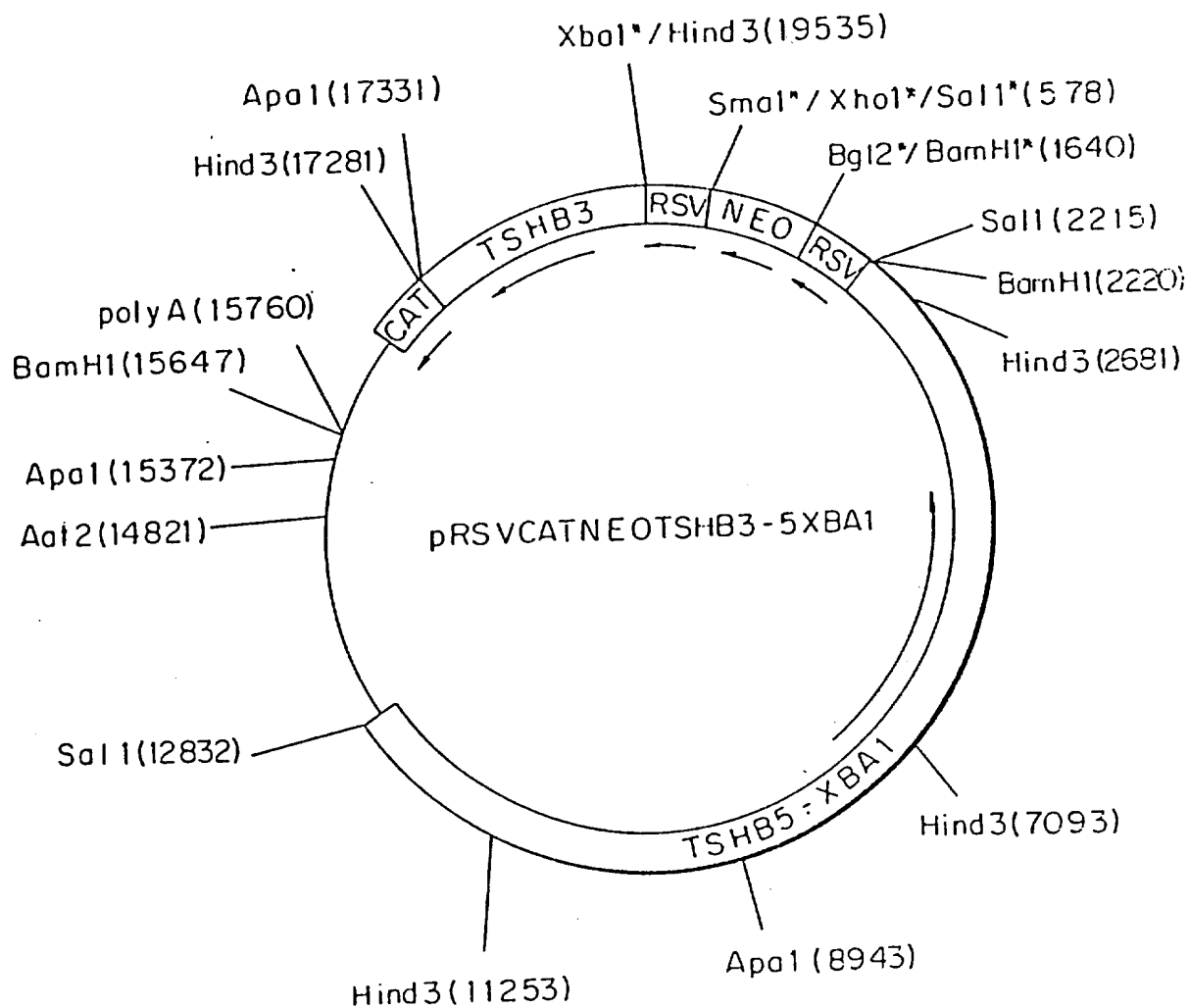
FIG. 12



SAITAS DAUGIAU NEEGZISTUOJA 17

RODYKLĖ RODO GENO KRYPTĮ 18

FIG. 13



SAITAS DAUGIAU NEEGZISTUOJA 19
 RODYKLĖ RODO GENO KRYPTĮ 26

TSH BETA STUKTURA

5' ggcacgccctctgaatgtggaaaggacacttatgagctctgtggctcttccctctgattt
 ag' CATGAATGCTGTCGTTCTCTTTTCCGTGCTTTTCGCTCTTGCTTGTGGCAAGTGT

5' TSHB5 3'
 AGTATATGATGTACGTGGACAGG
 CATCGTTTTGTATTCCCACTGAGTATATGATGTACGTGGACAGGAGAGAGTGTGCCTAC

TGCCTGACCATCAACACCACCATCTGCGCTGGGTATTGTATGACACGG gctgttgg

cactgcgtttcttttagctgtaaattgtacaggctctaaagttgctgttaatatatttag
 aaaggaagtgggataaatctatagctctctttgggaagccaagcacactgctttcaga
 attataattatgtcattctacacagaaaaagtaacagatcatgttaacagttaccctc
 aagtgtttgttctgctcaattggtagatgagaagaagtgctctttttgtctctgaggg
 gtttaagtgtagatgtgtgggtaacagagctcaggagtcctttaagatcatcagggaac
 aagggatatagtcattctattacacaaagttgcctgcagtttatcatgttaagatctc
 ttttcttccacag GATATCAATGGCAAAGTGTCTTCCCAAGTACGCACTCTCTCAG

GATGTCTGTACATACAGAGACTTCACCTACAGAACGGTGAAATACCGGGATGCCACA

CCATGTTGCTCCTTATTTCCTACCCCGTTGCCCTGAGCTGCAAGTGTGGCAAGTGTA

 G GACTCGACGTTACACCGTTAC

3' TSHB3 5'

AACTGACTACAGCGACTGTACACACGAGGCTGTCAAACCAACTACTGCACCAAGCCA
 CAGACATTCTATCTGGGGGATTTTCTGGTTAACTGTAATGGCAATGCAATCTGGTTAA
 ATGTGTTTACCTGGAATAGAACTAATAAAATATCATTGAT atgtcttgcctgcat
 aatccataggcacatccacaaggcatagagagcttacacaactttagaagcagagggc

22

EXONS 2 AND 3 ARE IN CAPITAL LETTERS

23

247 BP AMPLIFIED FRAGMENT UNDERLINED BY *

14 / 14

FIG. 15

TSH β RNR DETEKTAVIMAS VISOJE RNR

