

- (11) Patent numeris: **4230** (51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/00**
C12N 1/19
(21) Paraiškos numeris: **97-004** **C12N 15/18**
C12Q 1/68
(22) Paraiškos padavimo data: **1997 01 13** **C12N 15/62**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 07 25**
(45) Patent paskelbimo data: **1997 10 27**
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/06895**
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 05 31**
(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1997 01 13**
(31, 32, 33) Prioritetas: **259609, 1994 06 14, US**
(72) Išradėjas:
Kathleen H. Young, US
Bradley A. Ozenberger, US
(73) Patent savininkas:
AMERICAN CYANAMID COMPANY, a Maine corporation,
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940-0874, US
(74) Patentinis patikėtinis:
Virgina Adolfina Draugelienė, 8, UAB "TARPINĖ", A.P.Kavoliuko g. 24-152,
2050 Vilnius, LT
-

- (54) Pavadinimas:
Naujos ląstelių sistemos, kurioms būdinga rišamųjų peptidų porų specifinė sąveika

- (57) Referatas:

Išrdimas priklauso naujoms ląstelėms, ekspresuojančioms heterologinius sulietus baltymus, ir būdams atrinkti junginius, turinčius peptidų surišimo aktyvumą; kur būduose naudojamos šio išradimo naujos ląstelės. Naujos modifikuotos ląstelės šeimininkai apima:

a) genų seką, koduojančią heterologinį susilietą baltymą; aukščiau minėtą susilietą baltymą, apimantį pirmą peptidą iš rišamųjų peptidų poros arba segmentą iš anksčiau minėto pirmojo peptido, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišančiojo domeno, arba prie atitinkamo transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domeno;

b) genų seką, koduojančią heterologinį sulietą baltymą, anksčiau minėtą sulietą baltymą, apimantį antrą peptidą iš rišamųjų peptidų poros iš (a) arba segmentą iš anksčiau minėto antro peptido, prijungto arba prie DNR rišamojo domeno, arba jį atitinkančio transkripcijos aktyvavimo domeno, kuris nepanaudotas (a);

c) geną reporterį, efektyviai susietą su transkripcijos aktyvavimo baltymu arba jo dalimi;

d) jei reikia, deleciją arba mutaciją mielių ląstelės šeimininko chromosominėje DNR transkripcijos aktyvavimo baltymui, jei jis ląstelėje šeimininke yra.

Išradimas priklauso naujoms ląstelėms, ekspresuojančioms heterologinius sulietus baltymus, ir būdams atrinkti junginius, turinčius peptidų surišimo aktyvumą; kur būduose naudojamos šio išradimo naujos ląstelės.

Specifinis peptidų poros surišimas vienas prie kito indukuoja gyvoje ląstelėje didžiulį kiekį funkcijų. Pavyzdžiui, specifinis ligando surišimas su paviršiaus receptoriumi tarnauja kaip ląstelės reakcijų į daugelį išorinių signalų paleidiklis. Žinduolių ląstelės reaguoja į didelę įvairovę cirkuliuojančių peptidinių hormonų dažnai per atskirus tarpmembraninius domeno receptorius. Pripažinta, jog citokino receptorių grupė iliustruoja įvairius ląstelės funkcijos ir fiziologinės reakcijos aspektus. Nauji citokino receptoriaus funkcijos tyrimai atskleidė skirtingas ligandas-receptorių baltymo stochiometrijas, apimant kaip 2-baltymų (ligandas/receptorių) (Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR and JA Wells. (1991) Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254:821-825; Staten NR, Byatt JC and GG Krivi. (1993) Ligand-specific dimerization of the extracellular domain of the bovine growth hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 268:18467-18473), taip ir 3-baltymų (ligandas/receptorių/receptorių ar ligandas/receptorių/ perdavėjas) tarpusavio sąveiką (Young PR (1992) Protein hormones and their receptors. *Curr. Opin. Biotech.* 3:408-421; Taga T and T Kishimoto (1993) Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J.* 7:3387-3396; Mui A and A Miyajima (1994) Cytokine receptors and signal transduction. In: *Progress in Growth Factor Research*. pp 15-35. Pergamon Press. NY). Tokių baltymo asociacijų sudėtingumas buvo tiriamas *in vitro*, naudojant dažnai daug darbo reikalaujančius metodus (Fuh G., Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV and JA Wells. (1992) Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science* 256:1677-1680; Fuh G, Colosi P, Wood WI and JA Wells. (1993) Mechanism - based design of prolactin

receptor antagonists. *J. Biol. Chem.* 8:5376-5381; Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY and G Yancopoulos. (1993) LIFR and gp 130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartate CNTF receptor. *Science* 260:1805-1808), kadangi pasirodė, jog genetinės lengvai formuojamos ekspresijos sistemos buvo netinkamos. Šis išradimas yra nukreiptas į daugelį naujų modifikuotų sistemų, kurios gali būti panaudotos tokiems baltymų tyrimams, tuo labiau, kad naujos sistemos žymiai sumažina darbo sąnaudas.

Neseniai paskelbtos šiuolaikinio lygio sistemos nurodo "2-hibridų" sistemą, kaip diskutuota Fields S and O. Song. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246 ir taip pat Chein, C-T., Bartel, PL., Sternglanz R. and S. Fields (1991) The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a proteins of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88:9578-9582 . "2-hibridų" sistema apima įvairiapusę sąveiką tarp atskirų DNR surišimo ir aktyvavimo domenų iš mielių transkripcijos aktyvatoriaus, Gal 4. Heterologiniai baltymai yra ekspresuoti kaip hibridiniai baltymai, sulieti su bet kuria Gal4 dalimi (žiūrėti fig.1; Fields S and O. Song. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246; Chein, C-T., Bartel, PL., Sternglanz R. and S. Fields (1991) The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a proteins of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88:9578-9582 diskusiją apie 2-hibridų sistemą). Heterologinių baltymų sąveika sukelia Gal4 baltymo dviejų dalių tarpų ryšį, kuris aktyvina geno reporterio ekspresiją. Pagal šiuos duomenis tokios 2-hibridinės sistemos yra naudingos nustatant ar pirmoji duota tiriamųjų peptidų seka turi rišamąjį aktyvumą su jau žinoma antrojo peptido seka; kur tiriamojo peptido afiniškumas žinomam peptidui yra nežinomas. Tyrimai, naudojantys tokią sistemą, pasuko viduląstelių baltymų, tokių kaip transkripcijos faktoriai ir kinazės-taikinio baltymo, sąveikos tyrimo kryptimi (Young PR (1992) Protein hormones and their receptors. *Curr. Opin. Biotech.* 3:408-421 ; Durfee T., Becherer K., Chen P-L., Yeh, S-H., Yang Y., Kilburn AE., Lee W-H. and SJ Elledge. (1993) The retinoblastoma protein associated with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes and Devel.* 7:555-569 ; Li, JJ and I.

Herskowitz (1993) Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. Science 262:1870-1874).

Naujos modifikuotos šio išradimo ląstelės ir nauji būdai, pagrįsti šių ląstelių panaudojimu, sąlygoja pažangą tiriant ir atrandant peptidų imitatorius, tame tarpe ligandų ir receptorių imitatorius. Iki šiol niekas nesukūrė efektyvios ir specifinės atrankos sistemos šios srities tyrimuose. Naudojant ląstelėje rišamųjų peptidų porą, kuriai jungimosi afiniškumas yra žinomas, šis išradimas leidžia tirti rišamųjų peptidų poras, tokias kaip ligandas ir receptorius, kur peptidai rišasi dėl sąveikos tarp ląstelių. Šis išradimas turi pranašumą atrandant junginius, kurie gali kaip ligandai sąveikauti su specifiniais receptoriais ar perdavėjais. Įskaitant potencialius ligandus, bet neapsiribojant, žinduolių hormonai su receptoriais yra giminingi tarpląsteliniui ligandą rišančiam peptidui. Dar daugiau, šis išradimas aprašo panaudojimą ląstelių sistemų, kurios ekspresuoja gausius heterologinius baltymus, įskaitant du heterologinius sulietus baltymus, specifinio ir grįžtamo ligando ir receptoriaus ryšio nustatymui. Aukščiau aprašyto ryšio specifinė sąveika yra lengvai nustatoma pagal išmatuojamus pakitimus ląstelės fenotipe, pavyzdžiui, augimą ant selektyvios terpės.

Pirma, šis išradimas yra susijęs su naujomis modifikuotomis ląstelėmis šeimininkais, skirtomis heterologinių sulietų baltymų ekspresijai. Naujos modifikuotos ląstelės šeimininkai apima:

- a) genų seką, koduojančią heterologinį suslietą baltymą; aukščiau minėtą suslietą baltymą, apimantį pirmą peptidą iš rišamųjų peptidų poros arba segmentą iš anksčiau minėto pirmojo peptido, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišančiojo domeno, arba prie atitinkamo transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domeno;
- b) genų seką, koduojančią heterologinį sulietą baltymą, anksčiau minėtą sulietą baltymą, apimantį antrą peptidą iš rišamųjų peptidų poros iš (a) arba segmentą iš anksčiau minėto antro peptido, prijungto arba prie DNR rišamojo domeno, arba jį atitinkančio transkripcijos aktyvavimo domeno, kuris nepanaudotas (a);

- c) geną reporterį, efektyviai susietą su transkripcijos aktyvavimo baltymu arba jo dalimi;
- d) jei reikia, deleciją arba mutaciją mielių ląstelės šeimininko chromosominėje DNR transkripcijos aktyvavimo baltymui, jei jis ląstelėje šeimininke yra.

Šio išradimo naujos modifikuotos ląstelės šeimininkai gali būti panaudotos nustatyti tiriamų pavyzdžių sąveiką su atrinktu peptidu iš rišamųjų peptidų poros, pavyzdžiui, ląstelė gali būti panaudota tiriamo pavyzdžio sąveikos su atrinktais ligandu arba receptoriumi nustatymui.

Antra, čia pateikiamas išradimas susijęs su naujomis modifikuotomis ląstelėmis ir atrankos būdais, kurie nustato tiriamojo pavyzdžio sąveiką su atrinktu peptidu ir receptoriumi pagal atpažįstamus pakitimus fenotipe. Ląstelė rodo fenotipo pakitimus tik esant tiriamam junginiui, turinčiam surišimo afiniškumą peptidui, iš rišamųjų peptidų poros, pavyzdžiui, ryšio afiniškumas ligandui ar jo receptoriui.

Trečia, šis išradimas susijęs su naujomis ląstelėmis ir atranka būdų, leidžiančių nustatyti, prie kurio peptido iš rišamųjų peptidų poros rišasi tiriamasis pavyzdys.

Ketvirta, šis išradimas liečia naujas ląsteles, kurios ekspresuoja tris ar daugiau heterologinių komponentų aukštesnės eilės arba polibaltymų asociacijų tarp trijų ar daugiau peptidų tyrimui (pavyzdžiui, tokiam kaip ligando priklausomos dimerizacijos tyrimas).

Terminas **rišamųjų peptidų pora** apibūdina bet kurią peptidų porą, turinčią žinomą rišimosi afiniškumą, kuriai yra žinoma ar gali būti nustatyta DNR seka. Peptidai iš rišamųjų peptidų poros turi rodyti pirmumą rišimesi vienas su kitu, palyginus su kitais modifikuotos ląstelės komponentais.

Terminas **peptidas**, kaip panaudotas anksčiau ir bus minimas toliau, apibūdina bet kurį peptidą, polipeptidą arba baltymą, jei tik nenurodyta kitaip. Kaip nurodyta

anksčiau, peptidai iš rišamųjų peptidų poros gali būti ligandu ir bet kuriuo peptidu, turinčiu žinomą rišimosi afiniškumą ligandui.

Heterologinis, kaip paminėta aukščiau ir bus naudojama toliau, apibūdina peptidus, kurie (1) neekspresuojami natūraliai sutinkamose ląstelėse šeimininkuose, arba (2) modifikuotos ląstelės šeimininko ekspresuojami kitokiu ekspresijos būdu, negu tas, kuriuo ląstelė šeimininkas normaliai ekspresuotų peptidą.

Jei nenurodyta kitaip, terminas **receptorius**, kaip vartojama toliau, apima terminus **receptorius_r**, **tirpus receptorius**, **perdavėjas** ir **rišamasis baltymas**. Šiame išradime **receptorius** yra naudojama - **receptorius** arba **tirpus receptorius**, labiau tinkantis yra **receptorius**.

Receptorius_r, kaip pavartota žemiau, apibūdina plazmos membranos baltymus, kurie suriša specifines molekules, tokias kaip augimo faktoriai, hormonai arba neuromediatoriai, ir po to perduoda signalą tarp ląstelių, kas sukelia ląstelės specifinį atsaką. Tai apima atskirus tarpmembraninius baltymus.

Tirpus receptorius yra tarpmembraninis receptorius, sugebantis surišti ligandą. Šie receptoriai realizuojami iš ląstelės proteolizės keliu arba alternatyviai sujungiant mRNR.

Rišamasis baltymas apibūdina baltymus, kurie demonstruoja rišimosi afiniškumą specifiniam ligandui. Rišamieji baltymai gali būti gauti iš atskirų ir skirtingų genų. Duotam ligandui rišamieji baltymai, gauti iš specifinių genų, yra skirtingi nuo ligandą rišančio receptoriaus arba jo tirpaus receptoriaus domeno.

Perdavėjas apibūdina molekulę, kuri leidžia paversti vienos rūšies signalą į kitą. Ši molekulė yra žinoma kaip perdavėjas vienam ar daugiau peptidų iš rišamųjų peptidų poros, pavyzdžiui, perdavėjas ligandas/receptorius grupei.

Fig. 1 pavaizduota schema ląstelės, kuri ekspresuoja iš atskirų plazmidžių du heterologinius sulietus baltymus (vienas, būdamas ligandu, surištas su transkripcijos aktyvavimo baltymo aktyvavimo domenu; kitas baltymas, būdamas receptoriumi, surištas su transkripcijos aktyvavimo baltymo DNR surišimo domenu. Schema rodo dviejų sulietų baltymų ekspresiją ir ligando bei receptoriaus surišimą, kas suveda kartu rišamąjį domeną ir aktyvavimo domeną, atstatant transkripcijos aktyvavimo baltymą. Kada transkripcijos aktyvavimo baltymas atstatytas ir pritvirtintas DNR rišamojo domeno prie atvirkštinės aktyvavimo sekos vietos, yra inicijuojama geno reporterio (HIS3) transkripcija.

Fig. 2 patalpintos lėkštelių fotografijos, rodančios rezultatus augimo eksperimentų, atliktų pavyzdyje 1 kamienams CY722, CY723, CY724 ir CY781 ant neselektyvios terpės (foto A) ir selektyvios terpės (foto B).

Fig. 3 yra schema dimero modelio, kuriame ligandas prisiriša prie dvigubo receptoriaus sistemos. Scheminė diagrama vaizduoja ląstelę, kuri ekspresuoja baltymus iš trijų skirtingų plazmidžių. Yra ekspresuojami du heterologiniai sulieti baltymai (vienas baltymas yra pirmas receptorių, surištas su transkripcijos aktyvavimo baltymo aktyvavimo domenu, ir kitas baltymas yra antras receptorių, surištas su transkripcijos aktyvavimo baltymo DNR rišamuoju domenu) ir laisvas ligandas (t. y. ligandas, kuris nėra surištas nei su vienu iš dviejų transkripcijos aktyvavimo domenų), kuris yra ekspresuojamas iš trečios plazmidės. Fig. 3 rodo dviejų sulietų baltymų ekspresiją bei surišimą laisvo ligando ir dviejų receptorių, kas suveda kartu rišamąjį domeną ir aktyvavimo domeną, atstatant transkripcijos aktyvavimo baltymą. Kai transkripcijos aktyvavimo baltymas yra sukonstruotas ir prikabinamas prie DNR rišamojo domeno prie Atvirkštinės Aktyvavimo Sekos (AAS) vietos, yra inicijuojama geno reporterio (HIS3) transkripcija.

Fig. 4 parodytos augimo lėkštelės, gautos kamienams CY846, ir CY847 iš pavyzdžio 3, fotografija, rodanti priklausomą nuo ligando receptorių dimerizacijos stimuliaciją.

Šio išradimo modifikuota ląstelė yra naudojama kaip ląstelė šeimininkas. Efektyvi ląstelė šeimininkas šiame išradime turi būti apibrėžta genetiškai, konstruojant atitinkamą heterologinių sulietų baltymų ekspresiją, reporterį(ius) ir kitas norimas genetines manipuliacijas. Ląstelė šeimininkas gali būti bet kuri eukariotinė, stuburinių ar bestuburių ląstelė. Ląstelė šeimininkas gali būti žinduolių, o taip pat amfibijų, pavyzdžiui, *Xenopus* kiaušialąstė. Priimtinau, kai ląstelė šeimininkas yra grybo, pavyzdžiui, *Aspergillus* arba *Neurospora* ląstelė. Labiausiai tinkamos ląstelės šeimininkai yra mielių, pavyzdžiui, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* arba *Pichia pastoris*.

Modifikuota ląstelė šeimininkas naudoja mažiausiai du genus atskirai abiejų heterologinių sulietų baltymų ekspresavimui. Vienas iš šių sulietų baltymų apima pirmą peptidą iš rišamųjų peptidų poros arba jo segmentą, kuris yra prijungtas arba prie DNR rišamojo domeno, arba jį atitinkančio tarnskripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domeno. Antras sulietas baltymas apima antrą peptidą iš rišamųjų peptidų poros arba jo segmentą. Antras peptidas yra pririštas prie DNR rišamojo domeno, jei jis nepanaudotas pirmame heterologiniame sulietame baltyme. Ryšio tarp peptidų iš rišamųjų peptidų poros aktyvumas yra kontroliuojamas panaudojant geną reporterį, kuris operatyviai sujungtas su dviejų sulietų baltymų transkripcijos aktyvavimo baltymu.

Transkripcijos aktyvavimo baltymas gali plačiai varijuoti, tiek kiek DNR rišamieji domenai ir aktyvavimo domenai yra ištirti, ar gali būti nustatyti prieinamais metodais. Transkripciją aktyvuojantis baltymas gali būti bet kuris baltymas, turintis du komponentus, DNR rišamąjį komponentą ir aktyvavimo komponentą, kur tarnskripcijos aktyvavimo baltymas transkripcijos aktyvavimui turi rūgščių alfa spiralę. Geriau, kai transkripcijos aktyvavimo baltymas yra atrinktas iš Gal4, Gcn4, Hap1, Adr1, Swi5, Ste12, Mcm1, Yap1, Ace1, Ppr1, Arg81, Lac9, Qa1F, VP16, LexA, ne žinduolių branduolių receptorių (pavyzdžiui, ekdizono) arba žinduolių branduolių receptorių (pavyzdžiui, estrogeno, androgenų, gliukokortikoidų, mineralkortikoidų, retino rūgšties ir progesterono; žiūrėti Picard D, Schena M and

KR Yamamoto. (1990) An inducible expression vector for both fission and budding yeast. *Gene* 86:257-261). Tinkamiau, kai transkripcijos aktyvavimo baltymas yra mielių baltymas, ir dar geriau, jei jis išskirtas iš Gal4, Gcn4 ar Adr1. Reikia pažymėti, jog gali būti panaudotas bet kuris DNR rišamasis baltymas, kuris funkcionuoja su aktyvavimo domenu. DNR rišamasis baltymas gali būti pavaduotas DNR rišamajam domenui transkripcijos aktyvavimo baltymo, jei atpažįstamos sekos, operatyviai asocijuotos su genu reporteriu, yra atitinkamai sukonstruotos. Ne mielių rišamuosius baltymus iliustruoja žinduolių steroidų receptoriai ir bakterinė LexA (žiūrėti Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M and J Mülbrandt. (1991) Identification of the DNR binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300).

Genas reporteris yra parinktas, būtent todėl kad transkripcijos aktyvavimo baltymo rišimosi domenai gali būti reguliuojami plačiai žinomu ir tiesiu metodu. Dažniausiai genas reporteris yra parinktas remiantis jo kaina, jo aktyvumo matavimo nesudėtingumu ir žemu fonu (t.y. aktyvumas gali būti nustatytas esant santykinai žemam reporterio ekspresijos lygiui dėl aukšto signalas/fonas ir/arba santykinai žemo, arba nenustatomo aktyvumo). Reporteriu gali būti bet kuris reporteris, kuriam gali būti nustatytas aktyvumas bet kuriais prieinamais būdais. Reporterius, kurie gali būti panaudoti šiame išradime, iliustruoja genai reporteriai, pasirinkti iš grupių:

- a) lacZ, liuciferazės geno, žalio fluorescuojančio baltymo geno, CAT;
- b) genų, komplementuojančių auksotrofams, tokiems kaip HIS, URA, LEU, ARG, MET, ADE, LYS, TRF;
- c) geno, lemiančio atsparumą antibiotikams, tokiems kaip neor, KAN;
- d) genų, lemiančių jautrumą cheminiams preparatams, tokiems kaip CYH2, CAN1 (atsparumas kanavinui). Daugeliu atvejų tai gali būti tinkama genui reporteriui sustabdyti augimą (CYH2). Patogiausia geno reporterio aktyvumą nustatyti kolorimetriniu ar fluorescentiniu būdais ir/arba matuojant mielių ląstelių augimą.

Kaip pažymėta aukščiau, panaudotas modifikuotoje ląstelėje peptidas yra peptidas iš rišamųjų peptidų poros, kuriam yra žinoma DNR seka, kaip ir seka antram peptidui iš rišamųjų peptidų poros. Taigi, peptidais gali būti peptidai iš peptidų rišančio

komplekso, kuris sudarytas iš dviejų ar daugiau peptidų, kurie jungiasi vienas su kitu, suformuodami rišamąjį kompleksą. Peptidai iš rišamųjų peptidų poros gali būti specifinis ligandas ir atitinkamas receptorių arba bet kurie kiti peptidai, kurie pirmiausia rišasi vienas su kitu taip, kaip fermento subvienetai.

Vienas iš svarbių šio išradimo pasiekimų yra aptikimas to, jog modifikuota ląstelė, panaudodama transkripcijos baltymo rišančiuosius ir aktyvaus domenų, gali būti panaudota reguliuojant rišamuosius peptidus iš rišamųjų peptidų poros, kuri rišasi dėl tarpląstelinės sąveikos. Žinoma, jei pageidaujama, peptidai, kurie rišasi dėl viduląstelinės sąveikos, gali būti panaudoti kurioje nors iš naujų modifikuotų ląstelių ir šio išradimo būdų. Peptidai gali būti iš žinduolių ir nežinduolių ląstelių. Vienas iš svarbesnių šio išradimo pritaikymų yra susijęs su naujų modifikuotų ląstelių ir atitinkamų atrankos metodų panaudojimu tiriant gausias žinduolių peptidų sąveikas. Žinduolių peptidai apima žinduolių ligandas/receptorių sąveikas, tokias kaip hormonas/receptorių sąveika. Peptidinius hormonus, kurie gali būti panaudoti šiame išradime, iliustruoja peptidai, parinkti, bet neapsiribojant, iš vienos šių grupių:

- (a) grupės, turinčios citokinų, interleukinų, kraujodaros faktorių, insulino, insulinui panašių augimo faktorių, augimo hormono, prolaktino, interferonų ir augimo faktorių;
- (b) ligandų G-baltymų surištiems receptoriams;
- (c) ligandų bestuburių receptoriams;
- (d) ligandų guanililo ciklazės receptoriams;
- (e) ligandų tirozino fosfatazės receptoriams.

Alternatyviame tyrime peptidas yra augimo faktorius (AF), atrinktas iš epiderminio AF, nervų AF, leukemijos inhibitoriaus faktoriaus (LIF), fibroblasto AF, iš trombocitų gauto AF, vaskuliarinio endotelinio AF, auglio nekrozinio faktoriaus, onkostatino M, ciliarinio neurotrofinio faktoriaus (BNF), eritropoetino, steel faktoriaus, placentinio laktogeno ir transformuojančio AF β .

Įvairiuose labiau tinkamuose tyrimuose peptidinis hormonas yra ligandas G-baltymo surištam receptoriui, toks kaip augimo hormoną realizuojantis faktorius, sekretinas,

kraujo indų aktyvumą inhibuojantis peptidas, gliukagonas, tyrotropinas, interleukinas-8, luteinizacijos hormonas (LH), folikulą stimuliuojantis hormonas (FSH).

Papildomame alternatyviniame tyrime panaudotas peptidas yra peptidas iš bestuburių, toksai kaip tie, parinkti iš grupės, turinčios augalų systemino ir vabzdžių diferenciacijos peptidus. Nors tinkamiau, kai baltymas yra parinkti iš grupės, turinčios žinduolių peptidus, ir dar geriau - žinduolių peptidinius hormonus.

Reikia pažymėti, jog specifiniai receptorių tipai gali būti peptidai iš rišamųjų peptidų poros ir rišamųjų peptidų komplekso. Įvairūs receptoriai parenkami iš vienos šių grupių:

- a) ląstelės adhezijos molekulės;
- b) imunomodulatoriaus, antigeno atpažinimo ar prezentacijos molekulės ir kitų giminingų peptidų.

Ląstelių adhezijos molekulės iliustruoja: viduląstelinė adhezijos molekulė (VAM), vaskuliarinė ląstelių adhezijos molekulė (VLAM), tarpląstelinė adhezijos molekulė (TAM), fibronektinas, integrinas, selektinas ir fibrinogenas. Imunomodulatorius, antigeno atpažinimo ar prezentacijos molekulės yra: T ląstelių receptorių kompleksas, B ląstelių receptorių kompleksas, Fc receptoriai, pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas 1, pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas 2, CD4, CD8, CD27, CD30, MAC kompleksas.

Taip pat pažymėtina, kad specifiniais perdavėjų tipais gali būti rišamųjų peptidų poros ar rišamųjų peptidų komplekso peptidas. Perduodančiais baltymais gali būti bet kuris perduodantis baltymas, kuris suriša vieną peptidą iš rišamųjų peptidų poros ar rišamųjų peptidų komplekso. Perduodantys baltymai yra gp130, kh97, AIC2A, AIC2B.

Dažniausia heterologiniai sulieti baltymai išskiriami transformuojant mielių ląstelę autonomiškai replikuojančia plazmide, gebančia ekspresuoti sulietą baltymą, nors jie gali būti ekspresuojami esant chromosominei modifikacijai.

Kaip pažymėta, šio išradimo atrankos būdai skiriami tiriamojo pavyzdžio poveikio rišamųjų peptidų poros rišimuisi, pavyzdžiui, ligando-receptoriaus sąveikos, stebėjimui. Iš esmės, būdas apima geno reporterio aktyvumo nustatymą pridėjus tiriamąjį pavyzdį į šio išradimo modifikuotą ląstelę šeimininką esant sąlygoms, tinkamoms aktyvumui stebėti, esant pavyzdžiui arba sąlygose, kuriose modifikuota ląstelė šeimininkas turi tokį aktyvumą tik tai dalyvaujant, pavyzdžiui, galinčiam susirišti su rišamųjų peptidų pora. Dažniausiai geno reporterio aktyvumas nustatomas matuojant pasirinkto fenotipo pakitimą, kuris tiesiogiai koreliuoja su geno aktyvumu.

Šio išradimo naujos modifikuotos ląstelės lengvai panaudojamos įvairiuose atrankos būduose tiriamojo pavyzdžio gebėjimo surišti nustatymui. Tiriamasis pavyzdys gali būti peptidas, kuris yra apie dviejų amino rūgščių ilgio, arba nėra peptidinis cheminis junginys. Nepeptidinis tiriamasis junginys apima junginius, kompleksus ir druskas, taip kaip ir natūralius produktus, pavyzdžiui, tokius kaip augalų ekstraktai ir medžiagos, gautos iš fermentacijos terpės. Modifikuotos ląstelės šeimininkai auginamos tinkamose augimui sąlygose, kad ištirtų tiriamojo pavyzdžio poveikį rišamųjų peptidų poros rišamumui. Modifikuotos ląstelės šeimininkai patalpinamos į mitybinę terpę, kuri dažniausia susideda iš agarą su tiriamuoju pavyzdžiu, esančiu ant mitybinės terpės paviršiaus. Mitybinė terpė dažniausiai yra įprastinė skysta terpė su reagentais augimui (mitybai) ir vandens, kaip antai, mielių sintetinė terpė (YSM gaunama iš BIO101, taip pat žiūrėti Rose MD, Winston F, and P Hieter. (1990) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Vienas šio išradimo realizavimo būdų nukreiptas į naują modifikuotą ląstelę šeimininką ir atrankos būdą, kuris parodo tiriamojo junginio sąveiką su pasirinkta rišamųjų peptidų pora pagal atpažįstamą fenotipo pokytį. Ši modifikuota ląstelė šeimininkas keičia fenotipą tik tai dalyvaujant tiriamajam junginiui, turinčiam gebą rištis tik su vienu peptidu iš rišamųjų peptidų poros. Ši ląstelė šeimininkas yra

nurodoma kaip sistema "gelbėtoja". Paprastai ląstelės atsakas sukeliamas, kai sąveikauja abu transkripcijos aktyvavimo baltymo domenai. Be to, sistemoje "gelbėtojuje" neįvyksta teigiamas pokytis fenotipe, kai abu transkripcijos aktyvavimo baltymo domenai sąveikauja. Teigiamas pokytis būna tiksliai tada, kai tiriamasis pavyzdys nutraukia abiejų transkripcijos aktyvavimo baltymo domenų sąveiką. Sistemoje gelbėtojuje modifikuota ląstelė šeimininkas gali ekspresuoti mažiausiai du heterologinius sulietus baltymus. Be to, ląstelėje šeimininke yra: genas reporteris, efektyviai asocijuotas su transkripcijos aktyvavimo baltymu; kur minėtasis genas reporteris dėl transkripcijos aktyvavimo baltymo ar jo dalies trukdo specifinio fenotipo pasirodymai selektyvioje terpėje. Ląstelės šeimininko chromosominėje DNR mutacija sugrąžina fenotipo pasireiškimą selektyvioje terpėje nesant geno reporterio ekspresijai. Jei reikia, delecija ar mutacija įvykdoma ląstelės šeimininko transkripcijos aktyvavimo baltyme chromosominėje DNR tam, kad transkripcijos aktyvumas pasireikštų tiksliai esant produktyviai pasirinktos rišamosios poros sąveikai. Tiksliai kai rišamasis pavyzdys nutraukia transkripcijos aktyvumo baltymo abiejų domenų sąveiką, modifikuota ląstelė augs ar išgyvens, ar pademonstruos kitą atrinktą fenotipą. Dažniausiai fenotipas išreiškiamas ląstelės augimu.

Jei atrankos būdas, kaip aptarta anksčiau, naudojamas nustatyti ar tiriamasis pavyzdys sąveikauja, ar greičiau nutraukia peptidų rišimąsi, stebimą nesant tiriamajam pavyzdžiui, tai antrinė atranka naudojama tiriamojo pavyzdžio specifinei surišimo gebai nustatyti, t.y. prie kokio peptido iš rišamųjų peptidų poros jungiasi tiriamasis pavyzdys. Antrinė atranka naudoja šio išradimo naujas ląsteles, kur ląstelės adaptuojamos sukelti fenotipo pasireiškimą ar fenotipo pakitimą tik esant tiriamajam pavyzdžiui, kurį suriša vienas peptidų iš rišamųjų peptidų poros. Vienas iš bevelijamų būdų tiriamojo pavyzdžio specifinio rišimosi charakteristikų nustatymui apima naudojamas ląsteles, kurios turi efektyvų (santykinai didelį) vieno iš dviejų sulieto baltymo, turinčio vieną iš dviejų peptidų, kopijų skaičių. Efektyvus kopijų skaičius yra bet kuris kopijų skaičius, pakankamas tiriamojo pavyzdžio specifinio rišimosi nustatymui. Dažniausiai genų kopijų skaičius yra mažiausia maždaug 5, dažniausiai svyruoja nuo maždaug 5 iki maždaug 50, labiausiai bevelijama su didesniu kopijų

skaičiumi. Kitas sulietas baltymas palaikomas santykinai žemame lygyje (1 iki maždaug 2 kopijos ląstelei) arba įjungiant į ląstelės chromosomą, ar panaudojant chromosomų centromerinę seką ant ekspresuojančios plazmidės. Jei šio išradimo ląstelėje naudojamas pirmojo peptido didelis kopijų skaičius, ląstelė bus jautresnė tiriamajam pavyzdžiui, kuris suriša rišamųjų peptidų poros antrąjį peptidą, kadangi apribojantis antro peptido kiekis nulemia geno reporterio aktyvumo lygį, t.y. stebimas fenotipo pakitimas. Atvirkščiai, jei yra naudojamas geno, koduojančio rišamųjų peptidų poros antrąjį peptidą, didelis kopijų skaičius, tai ląstelė bus jautresnė tiriamajam pavyzdžiui, kuris riša pirmąjį peptidą, kadangi apribojantis antrojo peptido kiekis nulemia geno reporterio aktyvumo lygį (t.y. stebimas fenotipo pokytis). Tiesioginis tiriamojo pavyzdžio poveikio abiejų kamienų fenotipui palyginimas (receptorius>>>ligandas atžvilgiu ligandas>>>receptorius) parodo junginio specifinę baltymų sąveiką. Kaip aptarta anksčiau, genai, ekspresuojantys peptidus, taip kaip ir genas reporteris, dažniausia ekspresuoja transformuojant mielių ląstelę autonomiškai replikuojančia plazmide.

Šie išradimo papildomai modifikuota ląstelė šeimininkas nukreipta į ląsteles, kurios gali būti panaudotos tirti peptidų ligandus, kurie turi dvejopus receptorius ar receptorių ir perdavėją aktyvinimui ar signalo perdavimui iš daugybinio peptidų surišimo komponentų, t.y. trijų ar daugiau peptidų surišimo komponentų, ryšio.

Tam tikros klasės receptoriams receptorių dimerizacija yra kritiškas pirmas žingsnis signalo perdavimui. Dimerinės receptoriaus struktūros gali būti sudarytos iš identiškų receptoriaus subvienetų (pavyzdžiai: insulino receptorius, insulinui panašaus augimo faktoriaus-I (IAF-I) receptorius, iš trombocitų gauto augimo faktoriaus (TAF) receptorius, kinazės inertinio domeno receptorius (KDR) ar koloniją stimuliuojantis faktorius (KSF)-I receptorius), ar nevienodų receptoriaus subvienetų (pavyzdys: IL - 6R + gp130; insulino - IAF - I hibridinis receptorius, LIF+gp130; BNF+gp130; įvairūs interferono receptoriai).

Modifikuotos ląstelės šeimininko komponentės peptido, turinčio dvejopą receptorių sistemą, rišamumo (gebėjimo rišti) kontrolei yra šios: genų seka (a) yra genų seka, koduojanti heterologinį sulietą baltymą; minėtasis sulietas baltymas, turintis vieną peptidą iš daugybinio peptidų surišimo komplekso, ar minėtojo peptido segmentą, kuris jungiasi arba su vienu iš DNR rišamuoju domenu, ar jam atitinkančiu transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domenu; ir genų seka (b) yra genų seka, koduojanti heterologinį sulietą baltymą; minėtasis sulietas baltymas, turintis antrąjį minėtojo daugybinio peptidų surišimo komplekso peptidą ar segmentą minėtojo receptoriaus, sulieto su vienu iš DNR rišamuoju domenu ar jį atitinkančiu transkripcijos aktyvavimo domenu, bet kuris nenaudojamas punkte (a). Modifikuotoje ląstelėje šeimininke daugybinio peptidų surišimo komplekso, kaip antai, dvejopos receptoriinės sistemos tyrimui taip pat yra genas reporteris ir chromosominė mutacija peptido (ligandas/receptorius) sąveikos specifinei analizei, kaip aptarta toliau. Galima ekspresuoti trečiąjį peptidą (pavyzdžiui, ligandą), kad įvertintų lyginamąjį ir konkurentinį tyrimą.

Kaip pažymėta anksčiau, daugybinių peptidų surišimo kompleksų, t.y. aukštesnės eilės baltymų, kurie turi vieną ar daugiau peptidų, tyrimui faktiškai galima naudoti šio išradimo modifikuotą ląstelę šeimininką trijų ar daugiau peptidų ekspresijai. Tripeptidų surišimo komplekso atveju bet kurie du peptidai gali būti sulieti su abiem transkripcijos aktyvavimo baltymo komponentais. Pavyzdžiui, kad ištirtų ligando, kuris veikia per dimerizacijos receptorių, sąveiką, gali būti ekspresuoti receptoriai kaip sulieti baltymai su ligandu, ekspresuotu kaip nesulietas baltymas. Ši ląstelės šeimininko sistema gali būti panaudota polibaltymų fermentų kompleksų tyrimui. Kiekvienam daugybiniam peptidų surišimo kompleksui galima identifikuoti naujus peptidus, kurie sąveikauja su kompleksu ekspresuojant naujus baltymus iš atsitiktinių komplementarių DNR sekų (pavyzdžiui, cDNR bankas), sulietus su vienu iš transkripcijos aktyvavimo domenų. Tokioje sistemoje vienas iš žinomų rišamųjų peptidų komplekso peptidas yra sulietas su kitu transkripcijos aktyvavimo baltymo domenu, tuo metu kai kiti rišamųjų peptidų komplekso elementai ekspresuojami kaip nesulieti peptidai. Toliau pažymima, kad skaičius peptidų, ekspresuotų

modifikuotos ląstelės šeimininko, bus tik apribotas prieinamais detektavimo būdas ir ląstelės šeimininko pajėgumu.

Nauji atrankos būdai gali būti panaudoti identifikavimui junginių, sąveikaujančių su bet kuria rišamųjų peptidų pora, pavyzdžiui, bet kuris receptorių ir/ar ligandas. Taip pat ši modifikuotų ląstelių sistema su genu reporteriu atrinkimui sukurti gali būti panaudota bet kuriai baltymas-baltymas sąveikai, kad surastų naujus junginius, kurie nutraukia tą sąveiką. Specifiniais pavyzdžiais yra:

- a) kinazių baltymai, įterpti į auglį, gali būti patalpinti į sistemą greitam atrinkimui junginių, kurie blokuoja kinazė-taikinys sąveiką, ir tokiu būdu gali būti unikaliais vienetais prieš auglį;
- b) virusų apvalkalų baltymai, tokie kaip žmogaus imunodeficito viruso glikoproteinai, ir atitinkantys ląstelės paviršiaus receptorių baltymai, tokie kaip CD4, gali būti patalpinti į sistemą greitai atrankai junginių, kurie nutraukia šią sąveiką, ir gali būti antvirusiniais agentais;
- c) abu *Plasmodium* ribonukleotidų reduktazės enzimo subvienetai gali būti ekspresuoti sistemoje, kad atrinktų junginius, kurie trukdo šiai specifinei baltymo asociacijai ir tuo būdu gali būti naujais antimaliariniais agentais.

Toliau pateikiami pavyzdžiai yra skirti toliau iliustruoti įvairius šio išradimo aspektus. Jie negali būti aiškintini kaip ribojantys išradimą.

Pavyzdys 1: Specifinė ir grįžtama ligando - receptoriaus sąveika

Genai, koduojantys sulietus baltymus, yra produkuojami klonuojant augimo hormoną (AH) ir augimo hormono receptoriaus (AHR) cDNR sekas į plazmidės, turinčias domenų Ga14 kodavimo rajonus. DNR rišamųjų domenų (Ga14) suliejimai įkonstruojami į pAS2, kurios aprašytos Wade Harper J. Adami GR, Wei N, Keyomarsk K and SJ Elledge. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 Cyclin-dependent kinases. Cell 75:805-816. Genų aktyvavimo domenų (Ga14) suliejimai konstruojami į pACT-II, kuri yra tapati pACT (aprašyta Durfee T., Becherer K., Chen P-L., Yeh, S-H., Yang Y., Kilburn AE., Lee W-H. and

SJ Elledge. (1993) The retinoblastoma protein associated with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes and Devel.* 7:555-569), išskyrus modifikacijas su piliinkerių rajonu. Į Bg1 II įjungiamą tokia seka: Bg1 II - Hemagliutinino epitopas - NdeI - NcoI - SmaI - BamHI - EcoRI - XhoI - Bg1 II, adaptuotą iš polilinkerių sekos pAS2 (Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsk K and SJ Elledge. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 Cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816). cDNR, koduojanti kiaulės AH subrendusį baltymą, yra produkuojama standartiniu polimerazinės grandinės sintezės (PGS) metodu (žiūrėti Finny M. (1992) The polymerase chain reaction. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Chapter 15 Eds (FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, J Smith and K Struhl) John Wiley & Sons, NY).

Oligonukleotidai, gauti ABI oligosintezatoriumi, projektuojami pagal paskelbtą kiaulės AH cDNR seką (žiūrėti Su T-Z and MR E1-Geweley. (1988) A multisite - directed mutagenesis using T7 DNA polymerase: application for reconstructing a mammalian gene. *Gene* 69:81-89). Trisdešimties bazių 5' oligonukleotide yra NcoI saitas (5'-CATGCCATGGAGGCGCTTCCCAGCCATGCCC 3') ir dvidešimt septynių bazių 3' oligonukleotide yra BamHI saitas (5'-CGGGATCCGCAACTAGAAAGGCACAGCT-3'). AH cDNR generuojama naudojant kiaulės hipofizio lambda gt11 banką kaip matricą. 540 bp fragmentas yra gaunamas, surišamas su pCR II vektoriu (Invitrogen Corp.), rekombinantai yra patikrinami hidrolizuojant restrikcinius fermentais, ir DNR produkuojama kaip aprašyta Maniatus T, Fritsch EF and J Sambrook. (1982) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. cDNR seka nustatoma spalvine deoksine (dye-deoxy) baigmės reakcija naudojant Perkin-Elmer Cetus Corp. reagentus ir metodiką ir ABI 373A automatinį sekų analizatorių. AH cDNR yra tiesiogiai klonuojama į pACT-II per NcoI ir BamHI saitus. cDNR, koduojanti AHR tarpląstelinį domeną, produkuojama naudojant standartinius PGS metodus. Trisdešimt trijų bazių 5' oligonukleotide yra NcoI saitas (5'-CATGCCATGGAGATGTTTCCTGGAAGTGGGGCT-3') ir trisdešimt devynių

bazių oligonukleotide yra baigmės kodonas, einantis po NcoI saito (5'-CATGCCATGGCCTACCGGAAATCTTCTTCACATGCTGCC-3'), ir naudojami produkuoti 742 bp fragmentui, koduojančiam žiurkės AHR 1 - 247 amino rūgštis (Baumbach WR, Horner D. and JS Logan. (1989) The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes & Devel.* 3:1199-1205). Ši AHR cDNR klonuojama į pCRII vektorių, kaip aprašyta anksčiau, ir po to vėl subklonuojama į vektoriaus pAS2 NcoI saitą. Galutinių rekombinantinių vektorių DNR perkeliama ličio acetato metodu (Rose MD, Winston F, and P Hieter. (1990) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press) į mielių kamieną.

Mielės šeimininkas, (Y190), turinčios UAS_{GAL}-HIS geną reporterį, gaunamos pagal metodiką, aprašytą Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsk K and SJ Elledge. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 Cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816. Kamieno Y190 genotipas yra MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-901 his3d200 ade2-101 gal4 gal80 URA3: :GAL-lacZ LYS2: :GAL-HIS3 cyh^r. Y190 kamienas perkeliamas su abiem sulietom konstrukcijomis ar su vienintele sulieta konstrukcija ir priešpriešiniu vektoriumi, neturinčiu heterologinių sekų. Buvo rasta, kad kamienai vienodai auga neselektyvioje terpėje (fig. 2A). Po to šių kamienų augimas buvo tiriamas selektyvioje terpėje (t.y. mitybinė terpė be amino rūgšties, kuri sintezuojama aktyvuojant genui reporteriui). Tiksliai kamienas, turintis hibridinius baltymus, (CY722) gali augti, kadangi neauga tiksliai kamienas, turintis arba sulietą ligandą ar receptorių (CY724 ir CY723, atitinkamai; fig. 2B). Du kiekvieno kamieno nepriklausomi pavyzdžiai dryželiais užnešami ant sintetinės terpės, turinčios 2 % gliukozės, mielių azotinę bazę, amino sulfato, 0,1 mM adenino ir 60 mM 3-aminotriazolo (B lėkštelė) arba ant tos pačios terpės su histidino priedu (A lėkštelė). A lėkštelė inkubuojama prie 30°C tris dienas, lėkštelė B - penkias dienas. Šie rezultatai rodo, kad AH ir AHR gali būti nuo Gal4 priklausomo geno reporterio aktyvavimo mediatoriais sąveikoje, tokioje kaip ligando-receptoriaus rišimasis.

Pavyzdys 1a: Konkuruojančiai ekspresuotas laisvas ligandas (AH) esant AH ir AHR sulietims baltymams

Kad įvertintų akivaizdų AH prisijungimą prie jo receptoriaus svetimoje mielių branduolio aplinkoje, sistema modifikuojama pridėdant "trečią plazmidę", esančią "laisvo ligando" ekspresijos mediatoriumi, kad parodytų, kuris AH peptidas konkuruoja su AH-Ga14 sulietu baltymu, apgręžiant 2-hibrido sąveiką, parodytą pavyzdyje 1. Tėvinis kamienas Y190 (Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsk K and SJ Elledge. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 Cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816) auginamas ant terpės, turinčios 5-F-oroto rūgštį, atrinkti dariniams, kuriuose spontaniškai prarandamas URA3 genas (žiūrėti Rose MD, Winston F, and P Hieter. (1990) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Galutinis kamienas, pažymėtas CY770, naudojamas visuose eksperimentuose, turinčiuose efektus baltymų, kurios ekspresavo konkurentiškai trečias komponentas (t.y., trečia plazmidė). cDNR, koduojanti AH, yra produkuojama PGS metodais naudojant trisdešimt aštuonių bazių 5' oligonukleotidą, turintį EcoRI saitą (5'-CCGAATTCAAAATGGCCTTCCCAGCCATGCCCTTGTCC-3') ir dvidešimt šešių bazių 3' oligonukleotidą, turintį HindIII saitą (5'-CCAAGCTTCAACTAGAAGGCACAGCT-3') paskesniai sublokavimui į vektorių pCUP. pCUP yra indukuotas mielių ekspresijos vektorius, gautas iš pRS316 (Hill JE, Myers AM, Koerner TJ and A Tzagoloff. (1986) *Yeast / E.Coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites*. *Yeast* 2:163-167). Trumpai, šis vektorius konstruojamas įjungiant 3' mielių PGK geno (iš pPGK; Kang Y-S, Kane J, Kurjan J, Stadel JM and DJ Tipper. (1990) Effects of expression of mammalian G and hybrid mammalian-yeast G proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 10:2582-2590) galą į pRS316 klonavimo rajoną kaip BamHI-SalI fragmentą, kad taptų transkripcijos baigmės signalu. Prie šios plazmidės CUP1 promotoriaus rajonas (Butt TR, Sternberg EJ, Gorman JA, Clark P, Hamer D, Rosenberg M and ST Crooke. (1984) Copper metallothionein of yeast, structure of the gene and regulation of expression. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 81:3332-3336) praplečiamas PGS metodu kaip SacI-EcoRI fragmentas ir įterpiamas į atitinkamus

plazmidės saitus pCUP sukūrimui. AH ekspresijos plazmidė (AH-pCUP) yra toliau transformuojama su AH ir AHR sulietomis konstrukcijomis į kamieną CY770, kad produkuotų CY781. Laisvo AH ir AH ir AHR sulietų baltymų (CY781) konkurencinė ekspresija rodė nuo AH-AHR priklausomo ląstelės augimo ant selektyvios terpės blokavimą (fig. 2B). Šis eksperimentas patvirtina konkurenciją *in vivo* ir demonstruoja stebimos ligandas-receptorių sąveikos grįžtamumą.

Pavyzdys 1B: peptidinio hormono prolaktino (PRL) ir jo receptoriaus surišimas

Šios technologijos išplėtimui ir įvertinimui buvo ištirta panaši sistema naudojant peptidinį hormoną prolaktiną (PRL) ir jo receptorių. Prolaktinas struktūriškai giminingas AH ir prolaktino receptorių (PRLR) yra taip pat citokinų receptorių grupės narys. Kitaip negu žmogaus AH, subprimatų AH nelengvai jungia PRLR (Yang KH and FW Bazer (1989) Porcine endometrial prolactin receptors detected by homologous radioreceptor assay. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 64:145-154); PRL neriša lengvai AHR (Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds G, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters MJ and WI Wood. (1987) Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330:537-543). Subrendęs kiaulės PRL produkuojamas sulietas su GAL4 aktyvavimo domenu. Oligonukleotidai konstruojami pagal kiaulės PRL (gauta iš genų banko X14068) ir naudojama produkuoti subrendusį kiaulės baltyminį hormoną PRL iš kiaulės hipofizio lambdos gt11 banko naudojant PGS metodus. Trisdešimt vienos bazės 5' oligonukleotidas turi saitą (5'-CGGAATTCTGCCCCATCTGCCCCAGCGGGCCT-3') ir atitinka sekai, koduojančiai 1 - 7 amino rūgštis. Trisdešimties bazių oligonukleotidas turi EcoRI saitą (5'GAATTCACGTGGGCTTAGCAGTTGCTGTCG-3') ir atitinka cDNR 3' rajonui galiniam baigmės kodonui. 600 bp fragmentas yra gaunamas, sujungiamas su pCRII vektoriumi ir patvirtinamas restrikcinių fermentų karpimais ir bazių sekos analize. cDNR PRL klonuojama į pACT-II per EcoRI saitą.

Tarpląstelinis kiaulės PRL receptoriaus (PRLR) domenas produkuojamas sulietas su GAL4 DNR rišamuoju domenu. Oligonukleotidai projektuojami remiantis pelių

PRLR bazių seka (Davis J and DIH Linzer. (1989) Expression of multiple forms of the prolactin receptor in the mouse liver. Mol. Endocrinol. 3:674-680). Trisdešimt vienos bazės 5' oligonukleotide yra SmaI saitas (5'-TCCCCCGGGGATGTCATCTGCACTTGCTTAC-3'), tuo metu kai trisdešimt vienos bazės 3' oligonukleotide yra baigmės kodonas, po kurio seka SalI saitas (5'-TCCGTCGACGGTCTTTCAAGGTGAAGTCATT-3'). Šie oligonukleotidai riboja tarplastelinį PRLR domeną, koduojantį 1-229 amino rūgštis. Kiaulės hipofizio lambda gt11 bankas naudojamas kaip matrica. Panaudojus standartinius PGS metodus, 687 bp fragmentas produkuojamas, prijungiamas prie pCRII ir nustatoma nukleotidų seka. cDNR PRLR klonuojamas į pAS2 vektorių per SmaI ir SalI restrikcinius saitus.

Kamienas Y190 transformuojamas panaudojus sulietų PRL ar PRLR ekspresijos plazmidės arba pavieniui (CY727 ar CY728, atitinkamai), arba kartu (CY726). Ląstelės, ekspresuojančios tiek PRL, tiek ir PRLR suliejimus, gali augti ant selektyvios terpės, tuo metu kai kamienai, turintys tik jungtinį ligandą ar tikrai receptorių, negali. Šie rezultatai atspindi rezultatus, stebėtus AH-AHR sistemoje ankstesniame pavyzdyje, ir nustato bendrą 2-hibridinių sistemų panaudojimą tirti ligandų jungimuisi su šios grupės receptoriais.

Pavyzdys 1C: Papildomas ligando-receptoriaus specifiškumo naujai mielių

ląstelių šeimininko sistemai patvirtinimas

Papildomi kamienai yra išplėsti tirti ligando-receptoriaus specifiškumui, URA minus kamienai, ekspresuojantys AH ir AHR sulietus baltymus, transformuojami panaudojant pCUP ar PRL-pCUP; tuo metu kai kamienai, ekspresuojantys PRL ir PRLR sulietus baltymus, transformuojami panaudojant pCUP ar PRL-pCUP. Trumpai, PRL-pCUP konstruojamas būdu, panašiu aprašytam AH-pCUP. PRL cDNR generuojama PGS metodu naudojant trisdešimt trijų bazių 5' nukleotidą su EcoRI saitu (5'-GAATTCAAAATGCTGCCCCATCTGCCCCAGCGGG-3') ir iš pavyzdžio 1B 3' oligonukleotidą. Galutinis fragmentas įvedamas į pCUP per EcoRI saitą. Kaip parodyta ankstesniame pavyzdyje, kamienas, ekspresuojantis sulietus AH

ir AHR, be konkurentų auga ant selektyvios terpės, ir šis augimas sustabdomas laisvo AH ekspresija. Eksperimente su prolaktinu gauti panašūs rezultatai, kas patvirtina ligando-receptoriaus rišimosi specifiškumą mielių ląstelėje. Kamienas, turintis sulietus PRL ir PRLR (CY787), gali augti ant selektyvios terpės, ir šį augimą nutraukia laisvos PRL ekspresija (CY786; 1 lentelė).

AHR selektyvumui patikrinti kamienas, turintis sulietus AH ir AHR, transformuojamas panaudojant PRL-pCUP. Šis kamienas auga ant selektyvios terpės (CY785, 1 lentelė). Šie duomenys nurodo, kad AH rišimasis su jo receptorium šioje sistemoje gali būti efektyviai konkuruojamas perteklinio AH rišimosi, bet ne giminingo PRL peptido rišimosi (CY755). Anksčiau pateiktų trijų heterologinių baltymų ekspresavimo eksperimentų rezultatai iliustruoja ligando-receptoriaus sąveikos specifiškumą šio išradimo sistemoje.

1 lentelė. Kamienų sąrašas ir biobandymų rezultatai

Pavadinimas	AD sulietas	BD sulietas	pCUP	Augimas
CY700	-	-	-	0
CY722	AH	AHR	-	+
CY723	vektorius	AHR	-	0
CY724	AH	vektorius	-	0
CY726	PRL	PRLR	-	+
CY770	-	-	-	0
CY781	AH	AIIR	AII	0
CY784	AH	AHR	vektorius	+
CY785	AH	AHR	PRL	+
CY786	PRL	PRLR	PRL	0
CY787	PRL	PRLR	vektorius	+

• Visi mielių kamienai yra išvesti iš kamieno Y190 (Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsk K and SJ Elledge. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 Cyclin-dependent kinases. Cell 75:805-816). Genotipas yra *MATa gal4 gal180 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52*

leu2-3,112 URA3: :GAL-lacZ LYS2: :GAL-HIS3 *cyh*. Kamienai, pažymėti skaičiumi lygiu arba didesniu kaip 770, neturi *URA3: :GAL-lacZ* geno. Brūkšnelis žymi, kad kamienas neturi žymėtos plazmidės.

- AD suliejimai yra pACT dariniai; AH arba PRL sulieti su Gal4 aktyvavimo domenu.
- D suliejimai yra pAS2 dariniai; AH arba PRL receptorių tarpląsteliniai domenai sulieti su DNR rišimo domenu Gal4.
- pCUP žymi peptidus, ekspresuojamus iš pCUP plazmidės.
- Biobandymų rezultatai trumpai: kiekvienas kamienas auginamas selektyvioje terpėje nuo 3 iki 5 dienų esant 30° C temperatūrai, tada stebimas ląstelės augimas žymimas plius.

Pavyzdys 2: Atranka junginių, nutraukiančių sąveiką lidandas-receptorius

Mažo kopijų skaičiaus plazmidės, ekspresuojančios AHR- ar AH-Gal4 sulietus baltymus (pOZ153 ir pOZ152 atitinkamai), konstruojamos, kad sumažintų šitų baltymų ekspresiją. Be to, naujas genas reporteris yra konstruojamas taip, kad sutrukdytų ląstelių proliferaciją selektyvioje terpėje, jei ekspresija nenutraukta. Kad sukonstruotų AHR suliejimo ekspresijos plazmidę, SacI-BamHI restrikcijos fragmentas, turintis mielių struktūrinį promotorių ir GAL4 sekas, išskiriamas iš pAS1 (Durfee T., Becherer K., Chen P-L., Yeh, S-H., Yang Y., Kilburn AE., Lee W-H. and SJ Elledge. (1993) The retinoblastoma protein associated with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes and Devel.* 7:555-569) ir klonuojamas į pUN30 (Elledge SJ and RW Davis. (1988) A family of versatile centromeric vectors designed for use in the secteringshuffle mutagenesis assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 70:303-312). Tada AHR tarpląstelinis domenas suliejamas su GAL4 liguojant kaip NcoI fragmentą, kaip aprašyta pavyzdyje 1, kad sukurtų pOZ153. Kad sukonstruotų AH suliejimo ekspresijos konstrukciją, visas AH-Gal4 rajonas su promotoriaus ir baigmės sekomis yra atskiriamas iš plazmidės, aprašytos pavyzdyje 1, kaip PvuI-SalI fragmentas. Šis DNR segmentas yra klonuojamas į pUN100 (Elledge SJ and RW Davis. (1988) A family of versatile centromeric vectors designed for use in the secteringshuffle mutagenesis assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 70:303-312), produkuojantis pOZ152. Genas reporteris yra konstruojamas, atskiriant mielių CYH2 kodavimo rajoną ir tuoj pat prijungiant prie GAL promotoriaus rajono mielių

ekspresijos plazmidėje. Trumpai, GAL1 promotoriaus rajonas įterpiamas į YEp352 (Hill JE, Myers AM, Koerner TJ and A Tzagoloff. (1986) Yeast / E.Coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. Yeast 2:163-167) kaip 685 bp EcoRI-BamHI fragmentas. CYH2 sekos gausinamos PGS būdu naudojant oligonukleotidų pradmenis (5'-GGATCCAATCAAGAATGCCTTCCAGAT-3' ir 5'-GCATGCGTCATAGAAATAATACAG-3') ir pAS2 kaip matricą. PGS produktas yra hidrolizuojamas BamHI plius SphI ir klonuojamas į atitinkamą saitą YEp352-GAL vektoriuje. Šios plazmidės transformuojamos į mielių kamieną CY770, kuris turi mutaciją chromosominiame cyh2 gene, lemiančiame kamienui atsparumą baltymų sintezės inhibitoriui cikloheksimidui. Visų trijų plazmidžių buvimas būtinas, kad palygintų jautrumą cikloheksilimidui (cyh-).

Kamienas (CY857), turintis ligando ir receptoriaus suliejimų plazmidės plius plazmidę reporterį, sudaro pagrindą paprastam pirminiam atrinkimui junginių, kurie nutraukia AH rišimąsi su jo receptoriumi. Kamienas CY857 įterpiamas standartinėje mielių mitybinėje terpėje, turinčioje 10,0 µg/ml cikloheksilimido. Dėl to, kad ligando/receptoriaus sąveiką skatina CYH2 geno reporterio ekspresiją, kamienas yra jautrus cikloheksilimidui ir todėl negali augti. Cheminiai junginiai yra patalpinami ant šios tiriamosios terpės. Junginiai, kurie silpnina AH-AHR rišimąsi, yra identifikuojami pagal augimą ląstelių, supančių šį junginį, kadangi nesant CYH2 ekspresijai, ląstelės tampa atspariomis cikloheksilimidui, esančiam terpėje.

Antrinė atranka pavyzdžio taikiniui nustatyti

Ligando receptoriaus rišimosi nutraukimas šiame tyrime gali būti junginio reakcijos ar su receptorium, ar su ligando suliejimo komponentu pasekmė. Naujo junginio specifinis taikinis apsprendžiamas paprastu antriniu tyrimu, naudojant kamienus, perteklinai ekspresuojančius vieną iš sulietų baltymų. Kamienas CY858 ekspresuoja AHR-GAL4 suliejimus dideliu pertekliumi dėl konstrukcijos, esančios ląstelėse, esant dideliu kopijų skaičiui (pOZ149), tuo metu kai AH-suliejimas (pOZ152) lieka lygyje, panašiam baziniam kamienui (CY857). Priešingai, kamienas CY859 ekspresuoja AH-GAL4 suliejimą didesniu pertekliumi dėl to, kad ši konstrukcija yra

ląstelėse su dideliu kopijų skaičiumi (pKY14), tuo metu kai AHR suliejimas (pOZ153) yra lygyje, panašiam kaip bazinio kamieno (CY857). Junginiai, gelbstintys augimą pirminėje atrankoje naudojant CY857 (AH ir AHR suliejimai, ekspresuoti žemesnių kopijų skaičiaus plazmidžių) yra po to tiriami tokiu pat būdu, naudojant CY858 (AHR>>AH) arba CY859 (AH>>AHR) kaip tiriamąjį kamieną. Pavyzdžiui, kai ligando-receptoriaus rišimasis yra inhibuojamas junginiu, reaguojančiu su AHR, antrinė atranka pademonstruos stebimą pakeitimą matuojamame fenotipe. Gelbstinčio junginio antrinis tyrimas, atliktas kamienui CY858, kuris perteklinai ekspresuoja AHR suliejimą, rodo mažesnę augimą esant junginiui, negu augimas, stebėtas kamienui CY859. Šis žymus pakitimas matuojamame fenotipe įvyksta todėl, kad AHR perteklius titruoja junginį, dėl to padidėja CYH2 ekspresija ir ląstelės augimo inhibavimas. CY858 rodo žymų pakitimą, analogišką CY857, kadangi AHR sulietas baltymas yra limituojantis. Junginys, sąveikaujantis su ligando suliejimu, rodo priešingą pakitimą matuojamame fenotipe šiame antriniame tyrime.

Pavyzdys 3: Receptoriaus dimerizacijos, priklausomos nuo ligando, parodymas:

Daugybinės baltymų sąveikos (pavyzdžiui, ligandas-receptorius-receptorius) tiriamos išplėstine sistema, kuri ekspresuoja trečią baltymą, naudojant toliau pateiktą schemą.

Vienas receptoriaus dimero vienetas produkuojamas kaip sulietas baltymas ar su Gal4 DNR rišamuoju, ar su aktyvavimo domenu. Receptoriaus dimero kitas vienetas produkuojamas kaip sulietas baltymas su atitinkamu Gal DNR rišamuoju ar aktyvavimo domenu, kas nebuvo naudota pirmajam suliejimui. Genas, koduojantis ligandą, ekspresuojamas trečios plazmidės ir produkuojamas kaip laisvas (nesulietas) ligandas. Sulietų baltymų sąveika įvyksta tik esant ligandui (žiūrėti fig. 3).

Vaskuliarinio endotelio ląstelių augimo faktoriaus (VEAF) sąveika su jo konjugato receptoriaus ligandą rišančiu domenu (KDR, kinazę įterpiančią domeną turintis receptorius) aprašyta kaip pavyzdys šiai sistemai. KDR yra tirozino kinazės receptorius, ir dimero susidarymas (1 ligandas - 2 receptoriai), manoma, yra svarbus

hormono indukuotai receptoriaus funkcijai. cDNR, koduojanti KDR ligando domeną (Terman BI, Carrion ME, Kovach E, Rasmussen BA, Eddy RL and Shaw B. (1991). Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6:1677-1683) izoliuojama kaip Nco I - BamHI fragmentas ir klonuojama į pACT-II ir pAS2 vektorių. cDNR, koduojanti subrendusį baltymą VEGF, yra produkuojama, naudojant standartinį PGS būdą. Oligonukleotidai projektuojami pagal paskelbtą seką (žiūrėti Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva T. Gospodarowicz D, Fiddes JC, and JA Abraham. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266:11947-11954). Trisdešimt keturių bazių 5' oligonukleotidas, turintis EcoRI saitą (5'-CGGAATTCGAAGTATGGCACCCATGGCAGAAGGA-3') ir dvidešimt aštuonių bazių 3' oligonukleotidą, turintį EcoRI saitą (5'-CGGAATTCGGATCCTCATTTCATTCATCA-3'), naudojamas produkuoti 450 bp fragmentą, koduojantį subrendusį baltymą, ir klonuoti į pCUP saitą EcoRI. Galutinių rekombinantinių vektorių DNR transformuojama į mieles naudojant ličio acetato būdą, kad produkuotų tinkamą kamieną.

Mielių šeimininko kamienas (CY770) transformuojamas su KDR-pACT-II, KDR-pAS2 ir VEGF-pCUP, kad produkuotų kamieną CY846; arba transformuojamas abiem receptorių suliejimais ir pCUP, kad produkuotų kamieną CY847. Be to, ir KDR-pACT-II, ir KDR-pAS2 transformuojami kartu (CY845) ar atskirai (CY843 arba CY844) ar tikrai VEGF-pCUP (CY841) kaip kontroliniai kamieniai. Kamieniai tiriama ar jie auga selektyvioje terpėje. Kamienas (CY846), kuris ekspresuoja VEGF ligandą ir abiejų receptorių sulietus baltymus, žymiai labiau auga selektyviose terpėse lyginant su kamieniu CY847, kuris neekspresuoja VEGF ligando (žiūrėti fig. 4). Šie rezultatai rodo, kad efektyvios šio išradimo ląstelės gali būti naudojamos, kad iširtų receptoriaus dimerizaciją, priklausomą nuo ligando.

Pavyzdys 4: Atranka junginių, kurie yra ligandais dimerinių receptorių sistemoje

Receptoriaus vienetų dimerizacija (oligomerizacija) dažnai yra svarbus pirmas žingsnis aktyvuojant receptorių, tokius kaip augimo faktoriai, citokinai ir tokius, kurie aprašyti aukščiau. Nauja ląstelių sistema, aprašyta pavyzdyje 3, gali būti pritaikyta atrasti naujiems junginiams, kurie aktyvina (ar blokuoja) receptorių dimerizaciją. Tokie nauji sąveikaujantys junginiai gali būti efektyviais terapiniais agentais potologijoje, susijusioje su šiais receptoriais.

Plazmidės, ekspresuojančios dimerinių receptorių vienetą(us), kaip sulietus baltymus, produkuoja, kaip aptarta pavyzdyje 3. Kamienas (CY845), turintis KDR-pACT-II ir KDR-pAS2 suliejimus, yra paprastos plazmidės atrankos receptoriams, kurie turi dimerinę struktūrą, pavyzdys. Kamienas CY845 patalpinamas sintetinėje agaro terpėje, kurioje yra histidino trūkumas (Rose MD, Winston F, and P Hieter. (1990) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Tiriamasis junginys patalpinamas ant šios tiriamos terpės viršaus. Cheminiai junginiai, kurie stimuliuoja abiejų receptorių suliejimą (nesant ligando) sąveiką, pertvarko endogeninį transkripcijos aktyvatorių, kuris yra sujungtas su genu reporteriu, tokiu kaip HIS3. Pertvarkymas identifikuojamas ląstelių augimu aplink junginį.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Modifikuota ląstelė šeimininkas, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji apima:

- a) genų seką, koduojančią heterologinį susilietą baltymą; aukščiau minėtą susilietą baltymą, apimantį pirmą peptidą iš rišamųjų peptidų poros, arba segmentą iš anksčiau minėto pirmojo peptido, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišančiojo domeno, arba prie atitinkamo transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domeno;
 - b) genų seką, koduojančią heterologinį susilietą baltymą, anksčiau minėtą susilietą baltymą, apimantį antrą peptidą iš rišamųjų peptidų poros iš (a), arba jo segmentą, prijungtą arba prie DNR rišamojo domeno, arba jį atitinkančio transkripcijos aktyvavimo domeno, kuris nepanaudotas (a);
 - c) geną reporterį, efektyviai susietą su transkripcijos aktyvavimo baltymu, arba jo dalimi;
 - d) jei reikia, deleciją arba mutaciją mielių ląstelės šeimininko chromosominėje DNR transkripcijos aktyvavimo baltymui, jei jis ląstelėje šeimininke yra;
- be to, minėtas modifikuotas šeimininkas yra gebantis ekspresuoti bent du heterologinius sulietus baltymus ir bent vieną geną reporterį.

2. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta ląstelė šeimininkas yra eukariotinė ląstelė.

3. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta ląstelė šeimininkas yra žinduolių arba amfibijų ląstelė.

4. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta ląstelė šeimininkas yra grybo ląstelė.

5. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad grybo ląstelė šeimininkas yra *Aspergillus* arba *Neuropora* ląstelė.
6. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad grybo ląstelė šeimininkas yra mielių ląstelė.
7. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mielių ląstelė yra parinkta iš *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* arba *Pichia pastoris* ląstelių.
8. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad peptidai iš rišamųjų peptidų poros sąveikoja su kiekvienu kitu per tarpląstelinį aktyvumą jų natūralioje aplinkoje.
9. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad peptidai iš rišamųjų peptidų poros sąveikoja su kiekvienu kitu per ląstelės vidaus aktyvumą jų natūralioje aplinkoje.
10. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad rišamųjų peptidų pora yra parinkta iš grupės, turinčios žinduolių peptidus.
11. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad rišamųjų peptidų pora yra parinkta iš grupės, turinčios ne žinduolių peptidus.
12. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad rišamųjų peptidų pora yra parinkta iš grupės, turinčios ligandų ir atitinkamą receptorių.
13. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad vienas peptidas iš rišamųjų peptidų poros yra hormonas.

14. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad vienas peptidas iš išamųjų peptidų poros yra parinktas iš grupės, turinčios žinduolių peptidinių hormonų.

15. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas transkripcijos aktyvumo baltymas yra parinktas iš (a) Gal4, Gcn4, Hap1, Adr1, Swi5, Ste12, Mcm1, Yap1, Ace1, Ppr1, Arg81, Lac9, Qa1F, VP16, LexA arba (b) žinduolių branduolio receptorių.

16. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas transkripcijos aktyvavimo baltymas yra mielių transkripcijos aktyvavimo baltymas.

17. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas mielių transkripcijos aktyvavimo baltymas yra GAL4 arba lac9.

18. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad genas reporteris yra pasirinktas iš grupių:

a) lacZ, liuciferazės geno, žalio fluorescuojančio baltymo geno, chlorono fenikolo acetilo transferazės;

b) genų, komplementuojančių auktotrofams;

c) genų, lemiančių atsparumą antibiotikams; ir

d) genų, lemiančių jautrumą cheminiams preparatams.

19. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bent vienas iš heterologinių sulietų baltymų ekspresuojamas transformuojant mielių ląstelę autonomiškai replikuojančia plazmide, gebančia ekspresuoti sulietą baltymą.

20. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad heterologiniai sulieti baltymai ekspresuojami transformuojant mielių ląstelę autonomiškai replikuojančia plazmide, gebančia ekspresuoti sulietą baltymą.

21. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bent vienas peptidas iš išamųjų peptidų poros yra pariuktas iš vienos šių grupių:

- (a) grupės, turinčios citokinų, interleukinų, kraujodaros faktorių, insulino, insulinui panašių augimo faktorių, augimo hormono, prolaktino, interferonų ir augimo faktorių;
- (b) ligandų G-baltymų surištiems receptoriams;
- (c) ligandų bestuburių receptoriams;
- (d) ligandų guanililo ciklazės receptoriams;
- (e) ligandų tirozino fosfatazės receptoriams.

22. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 21 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad peptidas yra augimo faktorius, atrinktas iš epiderminio AF, nervų AF, leukemijos inhibitoriaus faktoriaus, fibroblasto AF, iš trombocitų gauto AF, vaskuliarinio endotelinio AF, auglio nekrozinio faktoriaus, onkostatino M, ciliarinio neurotropinio faktoriaus, eritropoetino, steel faktoriaus, placentinio laktogeno ir transformuojančio AF.

23. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 21 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bent vienas peptidas iš išamųjų peptidų poros yra perdavėjas.

24. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad perdavėjas yra atrinktas iš perduodančių baltymų grupės gp130, kh97, AIC2A ir AIC2B.

25. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bent vienas peptidas iš išamųjų peptidų poros yra receptorius, atrinktas iš vienos šių grupių:

- (a) ląstelės adhezijos molekulės;
- (b) imunomodulatoriaus, antigeno atpažinimo ar prezentacijos molekulės.

26. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad receptorių yra ląstelių adhezijos molekulė, atrinkta iš viduląstelinės adhezijos molekulės, vaskuliarinės ląstelių adhezijos molekulės, tarpląstelinės adhezijos molekulės, fibronektino, integrino, selektino ir fibrinogeno.

27. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad receptorių yra imunomodulatorius, antigeno atpažinimo ar prezentacijos molekulė, atrinkta iš T ląstelių receptorių komplekso, B ląstelių receptorių komplekso, Fc receptorių, pagrindinio audinių suderinamumo komplekso 1, pagrindinio audinių suderinamumo komplekso 2, CD4, CD8, CD27, CD30, MAC komplekso.

28. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 21 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad vienas peptidas iš išamųjų peptidų poros yra ligandas G-baltymo surištam receptoriui.

29. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 28 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ligandas G-baltymo surištam receptoriui yra atrinktas iš augimo hormoną atpalaiduojančio faktoriaus, sekretino, kraujo indų aktyvumą inhibuojančio peptido, gliukagono, interleukino-8, luteinizacijos hormono (LH), folikulą stimuliuojančio hormono (FSH) ir tyrotropino.

30. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad bestuburių peptidai yra atrinkti iš grupės, turinčios augalų systemino ir vabzdžių diferenciacijos peptidus.

31. Tiriamojo pavyzdžio poveikio išamųjų peptidų poros išsimosi sąveikai aptikimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima: geno reporterio aktyvumo nustatymą pridėjus tyriamąjį pavyzdį į 1 punkto modifikuotą ląstelę šeimininką esant sąlygoms, tinkamoms aktyvumui stebėti arba sąlygoms, kuriose modifikuota ląstelė šeimininkas turi minėtą aktyvumą tiksliai dalyvaujant pavyzdžiui, galinčiam susiristi su išamųjų peptidų pora.

32. Būdas pagal 31 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad geno reporterio aktyvumą nustato matuojant pasirinktą fenotipą, kuris priklauso nuo reporterio aktyvumo.

33. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad genas reporteris (c) yra efektyviai susietas su transkripcijos aktyvavimo mielių baltymu; kur minėtas genas reporteris selektyvioje terpėje trukdo stebimo fenotipo pasireiškimui dalyvaujant transkripcijos aktyvavimo mielių baltymui arba jo daliai; ir kai ląstelė šeimininkas be to apima: (e) jei reikia, deleciją arba mutaciją ląstelės šeimininko chromosominėje DNR, leidžiančią pasirodyti atrinktam fenotipui selektyvioje terpėje nedalyvaujant plazmidės (c) geno reporterio ekspresijai, jei reikalaujama, kad genas reporteris (c) būtų vienintelis išmatuoto aktyvumo šaltinis.

34. Tiriamojo pavyzdžio poveikio išamųjų peptidų poros išimui aptikimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas apima: modifikuotos ląstelės šeimininko pagal 33 punktą matuojamo fenotipo pokyčio stebėjimą įdėjus tiriamąjį pavyzdį į minėtąją modifikuotą ląstelę šeimininką; minėtąją ląstelę, auginamą sąlygose, tinkamose aptikti pasirinktąjį fenotipą, esant tiriamajam pavyzdžiui; arba auginama sąlygose, kuriose minėtoji ląstelė rodo fenotipą tiksliai esant tiriamajam pavyzdžiui, sąveikaujančiam su išamųjų peptidų pora.

35. Nustatymo būdas ar tiriamasis pavyzdys sąveikauja su išamųjų peptidų poros peptidu; minėtas būdas apima: (a) tiriamojo pavyzdžio įdėjimą į modifikuotą ląstelę šeimininką ir pasirinktojo fenotipo pasireiškimą esant tiriamajam pavyzdžiui ir nesant tiriamojo pavyzdžio; b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtoji modifikuota ląstelė šeimininkas pritaikyta pasireikšti paitimui fenotipe tiksliai esant tiriamajam pavyzdžiui, kuris išsisi su vienu peptidu iš išamųjų peptidų poros.

36. Būdas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas naudoja modifikuotą ląstelę šeimininką, kuris apima:

- a) genų seką, koduojančią heterologinį sulietą baltymą; minėtąjį sulietą baltymą, apimantį pirmąjį peptidą iš išamųjų peptidų poros ar minėtojo pirmojo peptido segmentą, kuris sujungtas ar su DNR išamuoju domenu, ar su jį atitinkančiu transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domenu; kur genas, koduojantis minėtąjį pirmąjį peptidą, yra efektyvaus kopijų skaičiaus;
- b) genų seką, koduojančią heterologinį sulietą baltymą, minėtąjį sulietą baltymą, apimantį antrąjį peptidą iš išamųjų peptidų poros iš papunkčio (a) ar minėtojo antrojo peptido segmentą, sulietą ar su DNR išamuoju domenu, ar su jį atitinkančiu transkripcijos aktyvavimo domenu, bet kuriuo nenaudotu (a);
- c) geną reporterį, efektyviai asocijuotą su transkripcijos aktyvavimo mielių baltymu ar jo dalimi;
- d) deleciją ar mutaciją transkripcijos aktyvavimo baltymui mielių ląstelės šeimininko chromosominėje DNR.

37. Būdas pagal 36 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mažiausia vienas iš heterologinių sulietų baltymų yra ekspresuojamas transformuojant modifikuotą ląstelę šeimininką autonomiškai replikuojančia plazmide, gebančia ekspresuoti minėtąjį sulietą baltymą.

38. Būdas pagal 36 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genas yra ekspresuojamas transformuojant modifikuotą ląstelę šeimininką plazmide, gebančia ekspresuoti minėtąjį geną reporterį.

39. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad genu seka (a) yra seka, koduojanti heterologinį sulietą baltymą; minėtas sulietas baltymas, apimantis vieną iš dviejų receptoriaus molekulių peptidų arba minėto receptoriaus segmentą, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišančiojo domeno, arba prie atitinkamo transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domeno; ir genų seka (b) yra genų seka, koduojanti heterologinį sulietą baltymą; aukščiau minėtas sulietas baltymas apima kitą receptorių peptidui arba segmentą iš

minėto receptoriaus, prijungto arba prie DNR rišamojo domeno, arba jį atitinkančio transkripcijos aktyvavimo domeno, kuris nepanaudotas (a).

40. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 39 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad genas (a) koduoja heterologinį sulietą baltymą; minėtas sulietas baltymas apima perdavėją peptidui arba minėto perdavėjo segmentą, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišančiojo domeno, arba prie jo atitinkamo transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domeno.

41. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 40 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad baltymas nešėjas yra išrinktas iš gp130, KH97, AIC2A ir AIC2B.

42. Tiriamojo pavyzdžio gebos funkcionuoti kaip ligandas receptoriui aptikimo būdas, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad jis apima: modifikuotos ląstelės šeimininko pagal 40 punktą geno reporterio aktyvumo lygio nustatymą pridėjus tiriamąjį pavyzdį į minėtąją ląstelę sąlygose, tinkamose aptikti minėtąjį aktyvumą.

43. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad genu seka (a) yra seka, koduojanti heterologinį sulietą baltymą; minėtas sulietas baltymas apima vieną peptidą iš daugybinio peptidų surišimo komplekso arba segmentą minėto peptido, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišamojo peptido domeno arba jį atitinkančio transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domeno; ir genų seka (b) yra genų seka, koduojanti heterologinį sulietą baltymą; minėtas sulietas baltymas apima antrąjį peptidą iš daugybinio peptidų surišimo komplekso arba segmentą minėto receptoriaus, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišančiojo domeno, arba jį atitinkančio transkripcijos aktyvavimo domeno, kuris nepanaudotas (a).

44. Tiriamojo pavyzdžio gebos funkcionuoti kaip daugybinio peptidų surišimo komplekso peptidų komponentas aptikimo būdas, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad jis apima: modifikuotos ląstelės šeimininko pagal 43 punktą geno reporterio aktyvumo

lygio nustatymą pridėjus tiriamąjį pavyzdį į minėtąją ląstelę sąlygose, tinkamose aptikti minėtąjį aktyvumą.

45. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 1 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad genu seka (a) yra seka, koduojanti heterologinį sulietą baltymą; minėtas sulietas baltymas apima vieną peptidą iš daugybinio peptidų surišimo komplekso arba segmentą minėto peptido, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišamojo peptido domeno arba jį atitinkančio transkripcijos aktyvavimo baltymo transkripcijos aktyvavimo domeno; ir genu seka (b) yra genu seka, koduojanti heterologinį sulietą baltymą; minėtas sulietas baltymas apima antrąjį peptidą iš daugybinio peptidų surišimo komplekso arba segmentą minėto receptoriaus, kuris yra prisijungęs arba prie DNR rišančiojo domeno, arba jį atitinkančio transkripcijos aktyvavimo domeno, kuris nepanaudotas (a); kur minėta modifikuota ląstelė šeimininkas toliau apima (e) bent vieną genu seką, koduojančią peptidą; kur modifikuota ląstelė geba ekspresuoti minėtus peptidus.

46. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 45 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad bent vienas komponentas (a), (b) arba (e) yra genu seka, atitinkanti komplementarų DNR banką.

47. Modifikuota ląstelė šeimininkas pagal 46 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad (b) yra genu seka, atitinkanti komplementarų DNR banką.

48. Atsitiktinai parinkto baltymo gebos funkcionuoti kaip daugybinio peptidų surišimo komplekso komponentas nustatymo būdas, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėtas būdas apima: modifikuotos ląstelės šeimininko pagal 47 punktą geno reporterio aktyvumo lygio nustatymą atsitiktinai parinkto iš DNR banko baltymo ekspresijos metu sąlygose, tinkamose minėtajam aktyvumui aptikti.

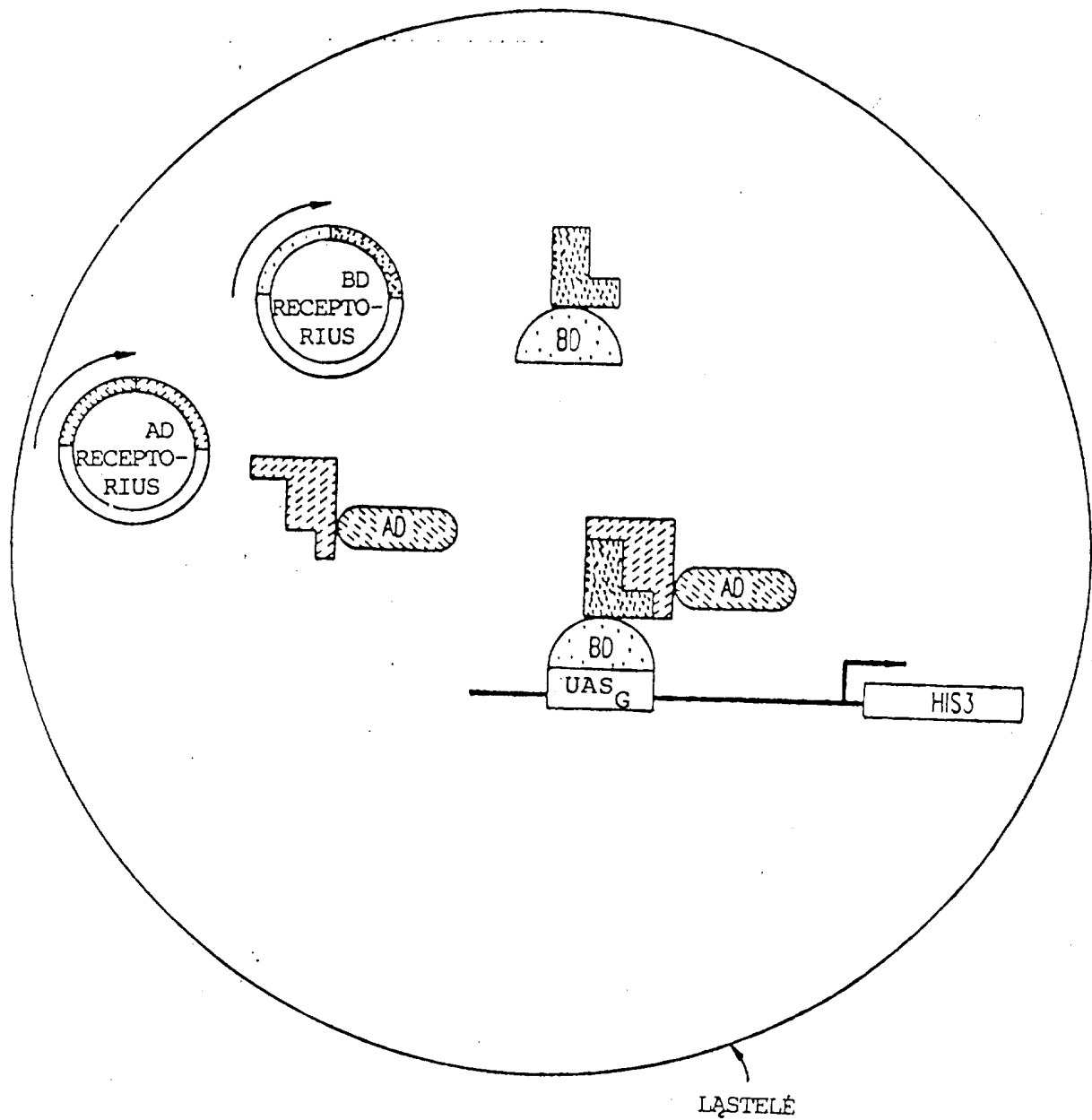


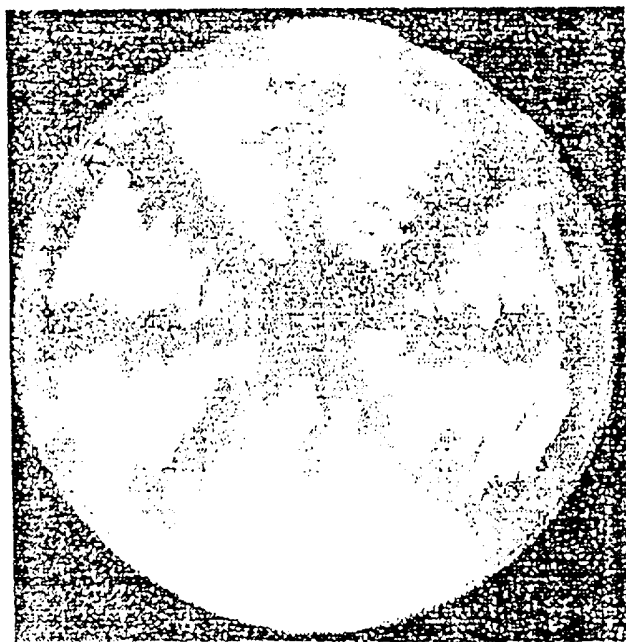
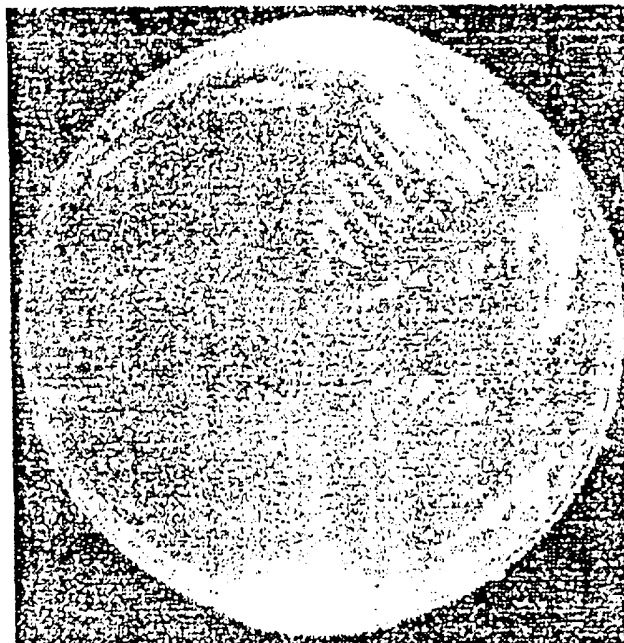
FIG.1

CY723
AHR^{BD}

CY724
A_HAD

CY723
AHR^{BD}

CY724
A_HAD



CY722

CY781

CY722

CY781

AHR^{BD} + A_HAD

AHR^{BD} + A_HAD + A_H

AHR^{BD} + A_HAD

AHR^{BD} + A_HAD + A_H

FIG. 2B

FIG. 2A

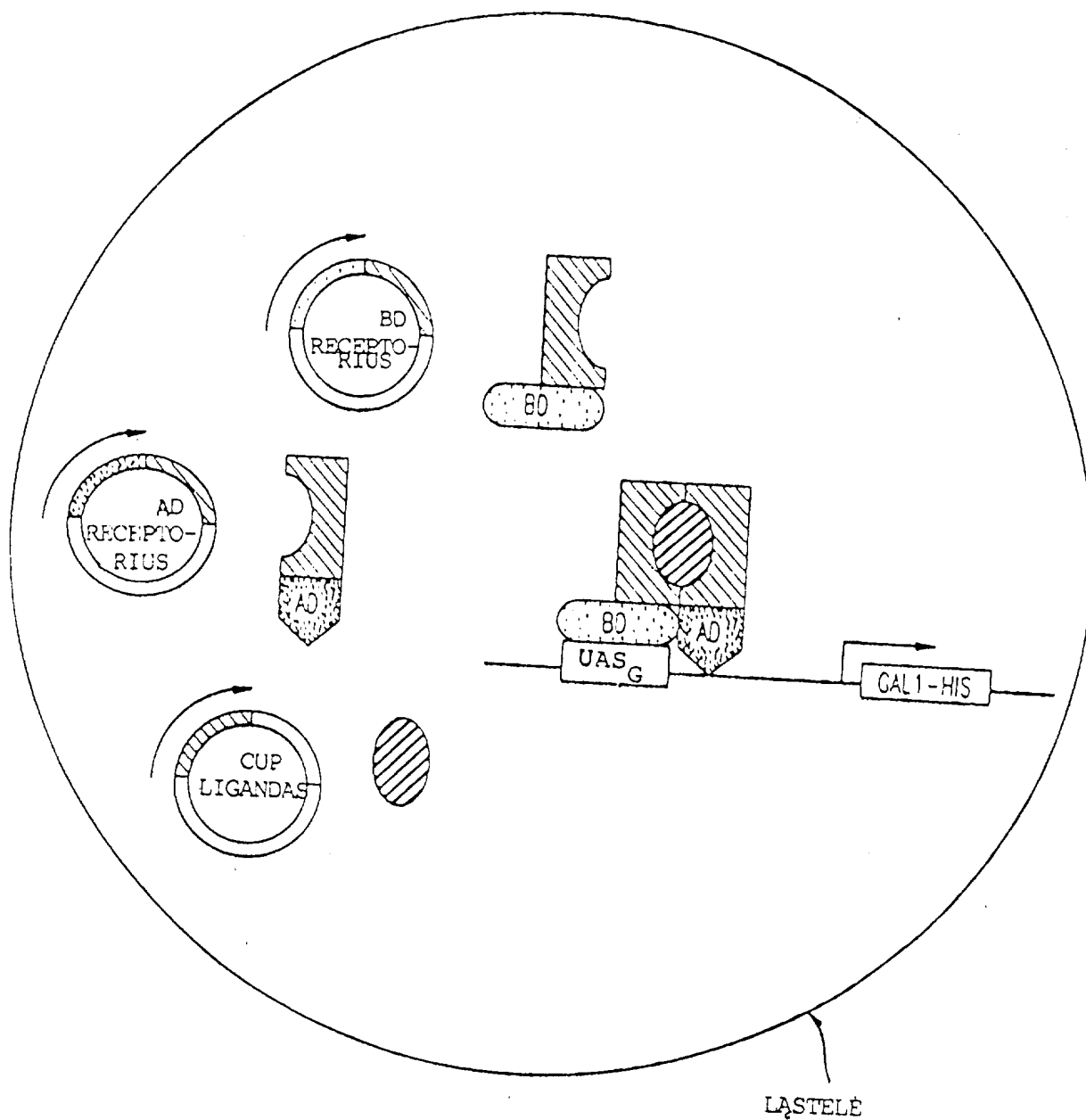


FIG.3

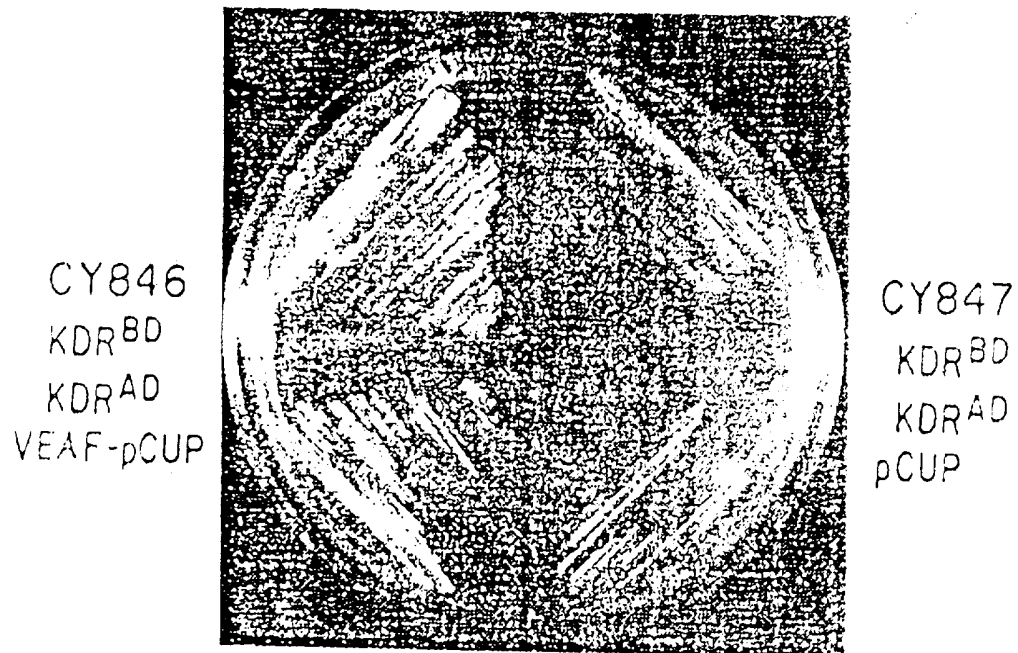


FIG. 4