

MOUZZK

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**



62.634/SZE

75359

**KIVONAT**

Hematopietikus protein, és az  
előállítására szolgáló anyagok és módszerek

ZymoGenetics, Inc., SEATTLE, Washington, US

University of Washington, SEATTLE, Washington, US

A bejelentés napja: 1994. 08. 05.

Elsőbbségei: 1994. 02. 14. (08/196,025) US

1994. 02. 25. (08/203,197) US

1994. 03. 21. (08/215,203) US

1994. 06. 01. (08/252,491) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/08806

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/21920

Hematopietikus proteineket valamint ezek polipeptid fragmentjeit biztosítjuk ideértve egerekből és emberekből származó proteineket és polipeptideket. Továbbá biztosítjuk a proteineket és a polipeptideket kódoló DNS molekulákat is, valamint az ezek termelésében hasznos vektorokat és sejteket. A proteinen levő epitóphoz kötődő antitesteket szintén biztosítjuk. A proteinek és polipeptidek hasznosak az in vivo és in vitro terápiában is, valamint reagensekként is a sejtenyésztés és a sejt szaporodás és fejlődés vizsgálatakor.

*fellind...*

*7...*

P96022k

62.634/SZE

S.B.G. & K.  
Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda  
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.  
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



11 A 11

Hematopietikus protein, és az  
előállítására szolgáló anyagok és módszerek

ZymoGenetics, Inc., SEATTLE, Washington, US

University of Washington, SEATTLE, Washington, US

Feltalálók: Richard D. HOLLY, SEATTLE, Washington, US  
Si LOK, SEATTLE, Washington, US  
Donald C. FOSTER, SEATTLE, Washington, US  
Frederick S. HAGEN, SEATTLE, Washington, US  
Kenneth KAUSHANSKY, WOODINVILLE, Washington, US  
Joseph L. KUIJPER, BOTHELL, Washington, US  
Catherine E. LOFTON-DAY, BRIER, Washington, US  
Pieter J. OORT, SEATTLE, Washington, US  
Steven K. BURKHEAD, SEATTLE, Washington, US

A bejelentés napja: 1994. 08. 05.

Elsőbbségei: 1994. 02. 14. (08/196,025) US

1994. 02. 25. (08/203,197) US

1994. 03. 21. (08/215,203) US

1994. 06. 01. (08/252,491) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/08806

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/21920

### Kereszt referencia és rokon alkalmazások

Ez a találmány a 08/215,203 sorozatszámú 1994. március 21-én iktatott szabadalom folytatólagos része, mely alkalmazás viszont az 1994. február 25-én iktatott 08/203,197 sorozatszámú alkalmazás része. Ez utóbbi alkalmazás az 1994. február 14-én iktatott 08/196,025 alkalmazás folytatólagos része, mely alkalmazások függőben vannak és az irodalmi hivatkozás révén részét képezik ezen találmánynak.

### A találmány háttere

A hematopoiesis az a folyamat, melynek során a vérsejtek a csontvelőben levő pluripotens törzssejtekből kifejlődnek és differenciálódnak. Ez a folyamat a polipeptid növekedési faktorok (citokinek) komplex részvételét foglalja magába, melyek a célsejtekre a membránhoz kötött receptorokon keresztül hatnak. A citokin működés celluláris szaporodást és differenciálódást eredményez, válaszul egy adott citokinre, mely gyakran származás specifikus és/vagy állapot specifikus. Egy egyedüli sejt típus, mint például a vérlemezkék kifejlődése egy törzssejtből számos megfelelő sorrendben ható citokinek koordinált működését teszi szükségessé.

Az ismert citokinek közé tartoznak az interleukinok, mint például az IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, stb; valamint a telep stimuláló faktorok, mint például a G-CSF, M-CSF, GM-CSF, az eritropoietin (EPO), stb. Általában, az interleukinek immun és gyulladáshoz kapcsolódó válaszok mediátoraiként működnek. A telep stimuláló faktorok a csontvelő eredetű sejtek szaporodását stimulálják, az érett leukocitákat aktiválják és egyébként a gazda gyulladási, fertőző és immunológiai kihívásaira adott válaszainak szerves részét képezik.

Különböző citokineket fejlesztettek ki terápiás anyagokként. Például az eritropoietint, mely az eritrociták fejlődését stimulálja, a vese elégtelenségből eredő anémia kezelésére használják. A telep stimuláló faktorok közül sok a rák terápiával

kapcsolatban kerül felhasználásra, a beteg immunrendszere helyreállításának felgyorsítására. Az interleukin-2, az alfa-interferon és a gamma-interferon bizonyos rákos megbetegedések kezelésében kerül felhasználásra. Egy a megakariocitopoiesist és a thrombopoiesist stimuláló aktivitást azonosítottak thrombocitopeniás állatok test folyadékában, ezekre az irodalomban "thrombopoietin"-ként utalnak (nemrégiben McDonald adott róla áttekintést, Exp. Hematol. 16:201-205, 1988 és McDonald, Am. J. Ped. Hematol. Oncol. 14:8-21, 1992). A több mint három évtizedes kutatás ellenére az ezen aktivitásért felelős faktort, vagy faktorokat eddig nem sikerült végérvényesen jellemezni, egyrészt a megfelelő forrás, a megfelelő vizsgálatok, valamint a termelési hely(ek) ismeretének hiányában.

A vérlemezkék rendellenes működésével kapcsolatos enyhe vérzéses rendellenességek (Mild Bleeding Disorders = MBDs) viszonylag gyakoriak (Bachmann, Seminar in Hematology 17:292-305, 1980), akárcsak számos veleszületett vérlemezke működési rendellenesség, ideértve a Bernard-Soulier szindrómát (a vérlemezke GPIb deficiencia), a Glanzmann-féle thrombastheniát (a GPIIb és GPIIIa deficiencia, (hiány)), a veleszületett afibrinogémia (a plazmában és a vérlemezkékben a fibrinogén szintjeinek csökkenése vagy hiánya), valamint a szürke vérlemezke szindrómát (az alfa-granulumok hiánya). Ezenkívül, számos a vérlemezke szekrécióval, tárolási összegyűjtött anyag hiánnyal, a vérlemezke arachidonsav reakcióút abnormalitásával, a vérlemezke ciklo-oxigenáz és thromboxán szintetázal, valamint a vérlemezke aktiválási hibákkal kapcsolatos rendellenesség létezik (Rao and Holmsen áttekintése, Seminars in Hematology, 23:102-118, 1986). Jelenleg ezen hiányok legtöbbjének molekuláris alapjai még mindig nem eléggé ismertek.

A vérlemezke proteinek izolálása és jellemzése felbecsülhetetlen értékű eszközt jelentene számos a vérlemezke rendellenes működés alapját adó rendellenesség tisztázásában. A részletes molekuláris analízis fő korlátozó lépése az analízishez és a cDNS könyvtár megszerkesztéséhez a vérlemezkékből vagy ezek prekursorából, a megakariocitákból való mRNS kinyerésével kapcsolatos nehézségek. A vérlemezkek mag és transzkripció nélküliek. A vérlemezkekkel kapcsolatos nyomokban levő mRNS-ek nehezen izolálhatók és gyakran degradálódnak. A vérlemezke cDNS könyvtár megszerkesztéséhez ezért nagy számú vérlemezke van szükség, tipikusan 25-250 egység teljes vérré (Izumi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7477-7481, 1990; Wicki et al., Thrombosis and Haemostasis 61:448-453, 1989; és Wenger et al., Blood 73:1498-1503, 1989) vagy az alapvető thrombocitemiának köszönhető emelkedett vérlemezke számmal rendelkező betegek pheresiséből (Roth et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 160:705-710, 1989). Ha vérlemezke-specifikus cDNS-eket izoláltak, akkor feltehetően az mRNS-ek a legszatbilabbak vagy ezek vannak legnagyobb mennyiségben a teljes mRNS típusok között és feltehetően a vérlemezkek teljes kódoló repertoárjának csupán egy kis frakcióját jelentik.

A vérlemezke cDNS könyvtárhoz egy alternatív útvonal a megakariocitákból - a vérlemezkek közvetlen celluláris prekursoraiból - izolált mRNSből való könyvtár izolálása és megszerkesztése. A megakariociták poliploid sejtek és azt várjuk tőlük, hogy a vérlemezke és megakariocita proteinek teljes komplementjét kódoló mRNS-t tartalmazzák. Azonban, nehéznek bizonyult a megfelelő számú és tisztaságú megakariociták izolálása.

A molekuláris biológia utóbbi előrelépései nagyban hozzájárultak a hematopoiesis megértéséhez azonban ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a folyamat meglehetősen bonyolult. Míg számos citokint jellemeztek és néhányat a



klinikai gyakorlatban is felhasználnak, továbbra is szükség van e területen további olyan anyagokra, melyek a mieloid és limfoid prekursorok szaporodását és differenciálódását, valamint az érett vérsejtek termelését stimulálják. Különösen nagy szükség van azokra az anyagokra, melyek a megakariocita származék sejtek, ideértve a vérlemezkéket, szaporodását és differenciálódását stimulálják. A tudomány e területén továbbá szükség van olyan anyagokra, melyek felhasználhatók a citopeniák kezelésében, ideértve a thrombocytopeniát, ez az állapot, amikor abnormálisan alacsony a keringő vérlemezkék száma (kevesebb mint  $1 \times 10^5$  vérlemezke/ $\text{mm}^3$ ), valamint más vérlemezke rendellenesség kezelésében. A jelen találmány eleget tesz ennek az igénynek és biztosít más kapcsolódó előnyöket is.

#### A találmány összefoglalása

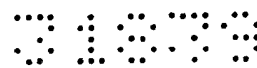
A jelen találmány egy célja hematopoiitikus aktivitással rendelkező izolált proteinek biztosítása.

A jelen találmány egy további célja hematopoiitikus aktivitással rendelkező proteinek termelésére szolgáló módszerek biztosítása, valamint az ezen módszerekben felhasználható izolált DNS molekulák, vektorok és sejtek biztosítása.

A jelen találmány egy további célja egy hematopoiitikus proteinen egy epitóphoz kötődő antitestek biztosítása.

A jelen találmány egy további célja a megakariociták, vérlemezkék és neutrofilek emlősökben, ideértve az embereket is, való termelésének stimulálására szolgáló módszerek biztosítása.

A jelen találmány egy további célja számos olyan eszköz biztosítása, mely a csontvelő sejt fejlődés, differenciálódás és szaporodás vizsgálatában használható, valamint a csontvelő sejt fejlődés, differenciálódás és szaporodás abnormalitásaival jellemzett betegségek detektálásában használható.



A találmány egy aspektusában a jelen találmány egy az alábbi csoportokból szelektált izolált proteint biztosít:

a) a 2. számú szekvencia aminosavainak szekvenciáját tartalmazó proteineket a 45 aminosavmaradéktól a 196 aminosav maradékig;

b) a 2. számú szekvencia aminosavainak szekvenciáját tartalmazó proteineket a 45 aminosavmaradéktól a 206 aminosav maradékig;

c) a 19. számú szekvencia aminosavainak szekvenciáját tartalmazó proteineket a 22 aminosavmaradéktól a 173 aminosav maradékig;

d) a 19. számú szekvencia aminosavainak szekvenciáját tartalmazó proteineket a 22 aminosavmaradéktól a 175 aminosavmaradékig;

e) az (a), (b), (c) vagy a (d) allelikus variánsait; és

f) az (a), (b), (c), (d) vagy az (e) faj homológokat, ahol az említett protein a mieloid vagy limfoid prekursorok szaporodását vagy differenciálódását stimulálja. Bizonyos megvalósulásokban a protein tartalmazza a 2. számú szekvencia 45-379 aminosav maradékait, vagy a 19. számú szekvencia 22-353 aminosav maradékait.

Egy ezzel kapcsolatos aspektusban a jelen találmány egy a fentiek szerint leírt proteint kódoló izolált polinukleotid molekulát biztosít. Egy megvalósulásban a polinukleotid molekula egy olyan DNS molekula, mely tartalmazza az 1. számú szekvencia 237-692 nukleotidjait vagy a 18. számú szekvencia 64-519 nukleotidjait magába foglaló nukleotid szekvenciát tartalmazó kódoló szálát. Egy másik megvalósulásban a molekula az 1. számú szekvencia 237-1241, 174-1241, 105-1241, 105-722, 174-722, vagy a 237-722 nukleotidjait tartalmazza vagy a 18. számú szekvencia megfelelő régióit. A jelen találmány továbbá biztosítja ezen molekulák allelikus variánsait, vagy egy hematopoietikus proteint kódoló DNS molekulákat, mely molekulák olyan proteint kódolnak, melyek az 1. számú vagy a 18. számú szekvenciák említett részeinek egyike által kódolt proteinnel aminosav szinten



legalább 80 %-os azonosságot mutatnak. Biztosítunk továbbá az ezen szekvenciákkal komplementer molekulákat is.

Egy másik aspektus szerint a jelen találmány biztosít egy olyan izolált DNS molekulát, melyet az alábbi csoportokból szelektáltunk:

(a) a pZGmp1-1081 plazmid (ATCC 69566) Eco RI-Xho I inzertje,

(b) az (a) allelikus variánsai; és

(c) az (a) vagy a (b) által kódolt proteinhez aminosav szinten legalább

80 %-os azonosságot mutató proteint kódoló DNS molekulák, ahol az izolált DNS molekula egy hematopietikus aktivitással rendelkező proteint kódol.

Egy másik aspektus szerint a jelen találmány a következő működőképesen kapcsolt elemeket tartalmazó expressziós vektort biztosít:

egy transzkripció promótert;

egy DNS szegmentet, melyet az alábbiakat magába foglaló csoportból szelektáljuk:

a) egy hematopietikus proteint kódoló, valamint az 1. számú szekvenciában bemutatott a 237-692 nukleotidokat magába foglaló nukleotid szekvenciát tartalmazó DNS szegmenteket;

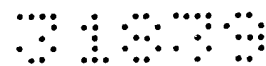
b) egy hematopietikus proteint kódoló, valamint az 18. számú szekvenciában bemutatott a 64-519 nukleotidokat magába foglaló nukleotid szekvenciát tartalmazó DNS szegmenteket;

c) az a) és b) allelikus variánsait; és

d) egy az a), b) vagy c) által kódolt proteinnel aminosav szinten legalább 80 %-os azonosságot mutató hematopietikus proteint kódoló DNS szegmentet;

valamint egy transzkripció terminátort.





Egy másik aspektusban, a jelen találmány olyan tenyésztett sejtet biztosít, melybe egy a fentiek szerint leírt expressziós vektort juttattunk be, ahol a sejt egy a DNS szegment által kódolt hematopoietikus proteint expresszál. Bizonyos megvalósulásokban a sejt fonalagomba sejt, egy emlős sejt vagy egy bakteriális sejt.

Egy másik aspektus szerint, a találmány egy olyan nem-humán emlőst biztosít, melynek csira vonalába egy a fentiek szerint leírt hematopoietikus proteint kódoló heterológ DNS szegmentet juttattunk be, ahol az emlős az említett DNS szegment által kódolt hematopoietikus proteint termeli.

Egy másik aspektusban a találmány egy emlősben való vérelemzésre termelés stimulálására szolgáló módszereket biztosít. Ezen módszerekben az emlős az alábbiakat magába foglaló csoportból szelektált hematopoietikus protein egy gyógyszerészetileg hatékony mennyiségét kapja:

(a) a 2. számú szekvencia 45-196 aminosav maradékokat tartalmazó aminosavainak szekvenciáját magába foglaló proteineket;

(b) a 19. számú szekvencia 22-173 aminosav maradékokat tartalmazó aminosavainak szekvenciáját magába foglaló proteineket;

(c) az (a) és (b) allelikus variánsait; és

(d) az (a), (b) vagy (c) faj homológjait, ahol a protein a mieloid vagy limfoid prekurzorok szaporodását és differenciálódását stimulálja egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval együtt.

A találmány ezen és más aspektusai egyértelműek lesznek az alábbi részletes leírásra és a csatolt rajzokra való hivatkozás révén.

### A rajzok rövid leírása

Az 1. ábra a pDX vektor részleges restrikciós térképét mutatja. A használt szimbólumok a következők: SV40 ori az SV40 replikációs origója; SV40 E SV40 erősítő; MLP adenovírus fő késői promóter; L1-3 adenovírus háromrészes vezető; ss hasítási jelek; pA poliadenilációs hely.

2. ábra a pBJ3 plazmid megszerkesztését illusztrálja. A használt szimbólumok a következők: TPIp TPI1 promóter; TPIt terminátor; AAT alfa-1 anti-tripszin cDNS; alfa alfa-faktor vezető, mTPO egér TPO kódoló szekvencia.

### A találmány részletes leírása

A találmány részletes leírása előtt hasznos lehet, ha megadjuk a találmány során használt bizonyos kifejezések meghatározását.

Allelikus variáns: Egy mutáció lévén létrejött gén alternatív formája, vagy a mutált gén által kódolt megváltozott polipeptid. A gén mutáció lehet csendes (nincs változás a kódolt polipeptidben), vagy kódolhat megváltozott aminosav szekvenciával rendelkező polipeptideket.

cDNS: Komplementer DNS, egy messenger RNS templát, vagy egy ilyen molekula klónjának vagy amplifikált kópiájának reverz transzkripciójával jön létre. A komplementer DNS lehet egyszálú vagy kétszálú.

Expressziós vektor: Egy lineáris vagy cirkuláris DNS molekula, mely egy a kérdéses polipeptidet kódoló szegmentet tartalmaz, olyan további szegmentekhez működőképesen kapcsolódva, melyek annak transzkripcióját biztosítják. Az ilyen további szegmentek közé tartoznak a promóter és terminátor szekvenciák, valamint magába foglalhat egy vagy több replikációs origót, egy vagy több szelektálható markert, egy erősítőt, egy poliadenilációs jelet, stb. Az expressziós vektorok általában plazmid vagy virális DNS-ből származnak, vagy tartalmazhatnak mind a

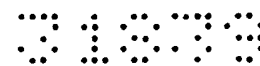
kettőből származó elemeket. A "működőképesen kapcsolódó" kifejezés azt jelzi, hogy a szegmentek olyan elrendezésűek, hogy szándékolt céljukkal összhangban működnek, például a transzkripció a promóterben kezdődik és a kódoló szegmenten keresztül zajlik a terminátorig.

Gén: A kromoszómális DNS egy polipeptid láncot kódoló szegmentje. Egy gén magába foglal egy vagy több aminosavat kódoló régiót, melyek bizonyos esetekben nem kódoló "közbeavatkozó szekvenciákkal" ("intronokkal") tarkítottak, együtt szomszédos, nem kódoló régiókkal, melyek a kódoló szekvencia transzkripcióját biztosítják.

Komplementer molekulák: egy komplementer bázis szekvenciával valamint a referencia szekvenciához képest reverz orientációjú polinukleotid molekulákat jelent. Például a 5'-ATGCACGGG-3' szekvencia az 5'-CCCGTGCAT-3' szekvenciával komplementer.

Promóter: Egy gén olyan régiója, melynél az RNS polimeráz kötődik és az mRNS szintézis elkezdődik.

Ahogy azt fent jeleztük, a jelen találmány anyagokat és módszereket biztosít a hematopoietikus aktivitással rendelkező proteinek előállítására. A találmány szerinti használatban a "hematopoietikus" kifejezés arra a képességre utal, hogy a protein a mieloid vagy limfoid prekursorok szaporodását és differenciálódását stimulálja ahogy azt standard vizsgálatokban meghatároztuk. Lásd, például, Metcalf, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5327-5330, 1980; Metcalf et al., J. Cell Physiol. 116:118-206, 1983; és Metcalf et al., Exp. Hematol 15:288-295, 1987. Tipikusan a csontvelő sejteket egy teszt minta és egy kontrol minta jelenlétében inkubáljuk. Ezután a tenyészetet megvizsgáljuk a szaporodásra és differenciálódásra vizuális vizsgálattal és/vagy festéssel. Egy különösen előnyben részesített vizsgálat a Mosman féle (J. Immunol.



Meth. 65:55-63, 1983; mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) MTT kolorimertiás vizsgálat, részletesen a példák között kerül leírásra.

A jelen találmány részben azon aktivitás felfedezésére alapszik, mely aktivitás az MPL receptoron keresztül a sejt szaporodást stimulálja. Ez a receptor (Souyri et al., Cell 63:1137-1147, 1990) ezen találmány előtt, egy "árva" receptor volt, melynek nem ismerték a természetes ligandumát. A példák között részletesen leírt klónozási és mutagenézises folyamatokban a feltalálók kifejlesztettek egy olyan sejtvonalat, mely egy MPL receptorhoz kötött reakciót stimulálásától függ az életben maradásához és szaporodásához, és mely a receptor autokrin stimulálására képes. Az ezen interleukin-3 (IL-3) független sejtektől származó kondicionált tápközegről azt találták, hogy elősegíti az MPL receptort expresszáló sejtek szaporodását, és máskülönben IL-3 függőek voltak. Az antitest neutralizációs vizsgálatok azt mutatták, hogy ez az aktivitás nem az IL-3-nak vagy az IL-4-nek köszönhető, valamint ez az MPL receptor oldott formájával semlegesíthető. Az IL-3 független sejtvonalból ezután egy cDNS könyvtárat állítottunk elő. A DNS-t baby hörcsög vese (BHK) sejtek transzfektálására használjuk és a transzfektánsokból származó tápközeget vizsgáltuk az MPL-függő sejt szaporodás stimulálására való képességre. Egy pozitív klónt izoláltunk, a rekombináns MPL ligandumot előállítottuk. Azt találtuk, hogy a rekombináns protein mieloid és limfoid prekursorok széles skálájának szaporodását stimulálja, valamint különösen, stimulálja a csontvelőben levő őssejtekből történő megakariociták és neutrofilek termelését. Továbbá, azt találtuk, hogy a rekombináns protein a teszt állatokban stimulálja a vérlemezkék termelését. Ezen adalékok fényében a proteint thrombopoietinnek (TPO) neveztük el.

A jelen találmány biztosítja a thrombopoietint kódoló polinukleotid molekulákat. Ebből a szempontból hasznos polinukleotid molekulák közé tartoznak az mRNS, a genom DNS, a cDNS, a szintetikus DNS és a különböző forrásokból



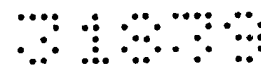
származó fragmentek ligálásával létrehozott DNS molekulák. A rekombináns TPO termeléséhez előnyben részesülnek az intron mentes DNS molekulák a legtöbb expressziós rendszerben való alkalmazáshoz. Az "izolált" kifejezés alatt olyan molekulák értendők, melyeket eltávolítottunk természetes genom környezetükből. Így a jelen találmány biztosít más génektől mentes DNS molekulákat, melyekkel ezek közönséges körülmények között kapcsolatban vannak. Különösen, a molekulák mentesek a mellékes vagy nem akart kódoló szekvenciáktól, valamint alkalmasak a génszintetileg manipulált protein termelési rendszerekben való felhasználáshoz.

A reprezentatív egér és humán TPO proteinek kódoló cDNS klónok szekvenciái sorrendben az 1. számú és a 18. számú szekvenciákban kerültek bemutatásra, valamint a megfelelő aminosav szekvenciák sorrendben a 2. számú és a 19. számú szekvenciákban kerültek bemutatásra. A tudomány e területén képzett szakember számára egyértelmű, hogy az 1., 2., 18. és 19. számú szekvenciákban bemutatott szekvenciák, valamint a 28. és 29. számú szekvenciákban bemutatott szekvenciák a rágcsáló vagy humán egyedüli alléloknak felelnek meg, valamint feltételezzük, hogy léteznek allelikus variánsaik. Az 1., 18. és 28. számú szekvenciákban bemutatott DNS szekvenciák allelikus variánsai, ideértve a csendes mutációkat tartalmazókat, valamint azokat, melyekben a mutációk aminosav szekvencia változásokat okoztak, a jelen találmány körébe tartoznak, mint ahogyan a 2. számú és a 19. számú szekvenciák allelikus variánsai is. A tudomány e területén képzett szakember számára egyértelmű, hogy létrehozhatók olyan helyek, melyek a nukleotid szekvencia manipulációját elősegítik alternatív kódonok felhasználásával.

A találmányban leírt rágcsáló és humán szekvenciák hasznos eszközök a más fajokból ("faj homológok") származó TPO-t kódoló izolált polinukleotid molekulák előállításában. Az ilyen előnyben részesített faj homológok közé tartoznak

az emlős homológok, mint például a szarvasmarha, a nyúl, a sertés, a birka, a ló és különösen a főemlős proteinek. Egy első fajból származó szekvencia információ egy második faj megfelelő polinukleotid szekvenciájához való klónozásának módszere jól ismert a tudomány e területén. Lásd, például Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987. A jelen találmány TPO-t kódoló DNS molekulái általában legalább 60 %, előnyösen legalább 80 % és esetleg 90-95 % vagy még magasabb %-ú szekvencia azonosságot mutatnak az 1. számú és a 18. számú szekvenciákkal és ezek allelikus variánsaival. A thrombopoietin molekulákat azon képességükkel jellemezzük, hogy képesek-e specifikusan kötődni az ugyanazon fajból származó MPL receptorhoz és *in vivo* stimulálják-e a vérlemezke termelést. Normális állati tesztekben a TPO képes a vérlemezke szintet 100 %-kal, vagy még jobban is megnövelni 10 napon belül a napi adagolás megkezdése után.

Az mRNS eloszlás analízise azt mutatta, hogy a TPO-t kódoló mRNS számos humán szövetben jelen van, sokkal nagyobb mennyiségben található azonban a tüdőben, a májban, a szívben, a vázizomban és a vesében. Így az eltérő fajokból való homológok izolálásához egy cDNS könyvtárat készítettünk előnyösen az egyik olyan szövetből, melyről úgy találtuk, hogy magas szinten termeli az mRNS-t. A cDNS könyvtárak előállítására szolgáló módszerek jól ismertek a tudomány e területén. Lásd, például Sambrook et al., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, valamint az itt hivatkozott irodalmakat. A TPO-t kódoló molekulák detektálásához ezután a könyvtárat az itt leírt egér vagy humán cDNS-sel, vagy ezek fragmentjével, vagy az itt leírt szekvenciák egy vagy több kisebb próbáival próbáltatjuk. Különösen hasznosak azok a próbák, melyek legalább 14 vagy több, egészen 25-ig terjedő nukleotidot tartalmazó oligonukleotidot tartalmaznak, melyek legalább 80 %-os



azonosságot mutatnak az 1. számú, a 18. számú és a 28. számú szekvenciák azonos hosszúságú részeivel, vagy ezek komplementer szekvenciával. Előnyben részesül, ha a könyvtárat alacsony hibridizációs körülmények között próbáltatjuk, azaz kb 2x SSC-ben és a hibridizációs hőmérséklet körülbelül 50 C° hőmérséklet és jelölt próbát alkalmazunk. Azokat a molekulákat, melyekhez a próba hibridizálódik standard detektálási eljárásokkal detektáljuk. A pozitív klónokat szekvencia analízissel és aktivitási vizsgálattal megerősítjük, mint például azon képességükkel, hogy tudnak-e kötődni a homológ MPL receptorhoz (azaz a cDNSSel megegyező fajtól származó MPL receptorhoz), vagy stimulálják-e a homológ csontvelő sejtekből történő hematopoiesist. A tudomány e területén képzett szakember számára egyértelmű, hogy más klónozási módszerek is felhasználhatók.

A TPO-t kódoló polinukleotid molekulák (ideértve az itt leírt molekulák allelikus variánsait és faj homológjait) szintén izolálhatók egy olyan sejtvonalból való klónozással, mely sejtvonal az MPL ligandumot termeli és autokrin szaporodási stimulálást mutat. Röviden, egy faktor-függő sejtvonalat transzfektálunk, hogy expresszálja az MPL receptort (Vigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5640-5644, 1992; Skoda et al., EMBO J. 12:2645-2653, 1993; és a 17. számú szekvencia), majd mutáltatjuk és a faktor-független sejteket szelektáljuk. Ezután ezeket a sejteket használjuk a TPO mRNS forrásaként. A megfelelő faktor-függő sejtvonalak közé tartoznak az IL-3-függő BaF3 sejtvonal (Palacios and Steinmetz, Cell 41:727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), az FDC-P1 (Hapel et al., Blood 64:786-790, 1984) és a MO7e (Kiss et al., Leukemia 7:235-240, 1993). Szaporodási faktor-függő sejtvonal létrehozható a közzétett módszerek segítségével (például Greenberger et al., Leukemia Res. 8:363-375, 1984; Dexter et al., in Baum et al., Eds., Experimental Hematology Today, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980). Egy tipikus eljárás során a

sejteket eltávolítjuk a kérdéses szövetből (például csontvelő, lép, magzati máj) és egy hagyományos, szérummal kiegészített tápközegben szaporítjuk, mint például 10 % magzati borjú szérummal (FBS), 15 % lószérummal és  $10^{-6}$  M hidrokortizonnal kiegészített RPMI 1640-ben. Egy-két hetes időtartam után a nem adherens sejteket összegyűjtjük, és a tenyészetek tápközegét friss tápközegre cseréljük. Az összegyűjtött, nem adherens sejteket mossuk és hozzáadott növekedési faktoral kiegészített tápközegben tenyésztjük (például RPMI 1640 + 10 % FBS + 5-20 % WEHI-3 kondicionált tápközeg az IL-3 forrásaként). Ezeket a sejteket friss tápközeggel tápláljuk egy két hetes időtartamig és bővítjük, ahogy a tenyészet szaporodik. Néhány hét - néhány hónap után az egyes klónokat izoláljuk oly módon, hogy a sejteket félszilárd tápközegre (például metilcellulózt tartalmazó tápközegre) szélesztjük, vagy korlátozott higitással. A klónok faktor függőségét úgy erősítjük meg, hogy az egyes klónokat a növekedési faktor hiányában szaporítjuk. Retrovirális fertőzést vagy kémiai mutagenézist használhatunk a növekedési faktor-függő sejtek nagyobb gyakoriságának eléréséhez. Ezután a faktor-függő sejteket transzfektáljuk, hogy expresszálják az MPL receptort, majd mutáltatjuk, például kémiai kezeléssel, ultraibolya sugárzásnak, vagy röntgen sugárzásnak vetjük alá, vagy retrovirális inzertációs mutagenézisnek. Ezután a mutagenizált sejteket olyan körülmények között tenyésztjük, mely körülmények között a sejtek túlélése az autokrin növekedési faktor termelésétől függ, azaz a szülői sejtek által igényelt exogén növekedési faktor(ok) hiányában. A TPO termelést szkrineléssel erősítjük meg, mint például az MPL receptort expresszáló és nem expresszáló sejteken levő kondicionált tápközeg tesztelésével, vagy a kondicionált tápközeg tesztelésével, az oldható MPL receptor vagy az ismert citokinek elleni antitestek jelenlétében.

A jelen találmány biztosít olyan izolált proteineket, melyek alapvetően homológok a 2. számú és a 19. számú szekvenciák proteinjeivel, valamint ezek faj





homológjaival. Az "izolált" kifejezés olyan proteint takar, melyet a természetstől eltérő környezetben találunk meg, mint például a vértől vagy az állati szövetből eltérő helyen. Egy előnyben részesített formában az izolált protein alapján véve mentes más proteinektől, különösen más állati eredetű proteinektől. Előnyben részesül, ha nagy tisztaságú proteineket biztosítunk, például 95 %-os tisztaságán, még előnyösebben 99 %-os tisztaságnál tisztábbakat. Az "alapjában véve homológ" kifejezés a találmány szerinti használatban olyan proteineket takar, melyek 50 %, előnyösen 60 %, még előnyösebben legalább 80 % szekvencia azonosságot mutat a 2. számú vagy a 19. számú szekvenciákban bemutatott szekvenciákkal, vagy ezek faj homológjaival. Ezek a proteinek még előnyösebben legalább 90 % azonosságot mutatnak és legelőnyösebben 95 %-os vagy annál nagyobb azonosságot a 2. számú vagy a 19. számú szekvenciákkal vagy ezek faj homológjaival. A százalékos szekvencia azonosságot hagyományos módszerekkel határozzuk meg. Lásd, például Altschul et al., Bull. Math. Biol. 48:603-616, 1986 és Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992. Röviden, két aminosav szekvenciát egymás mellé állítunk a felsorakoztatási pontok optimalizálása céljából egy 10-es rés nyitó hibapontot használva egy 1-es rés extenziós hibapontot és a Henikoff és Henikoff féle (ibid) pontozási mátrixot, a "blosum 62" mátrixot használva amint azt az 1. táblázatban bemutatjuk (az aminosavakat a standard egy betűs kódokkal jelöljük). A százalékos azonosságot ezután számoljuk ki, mint:

$$\frac{\text{az azonos párosodások teljes száma}}{\text{[a hosszabb szekvenciák hosszúsága + a két szekvencia felsorakoztatásának megvalósításához a hosszabb szekvenciába bejuttatott rések száma]}} \times 100$$

1. táblázat

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-4	-3	4											
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6							
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-1	-2	-4	7						
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-1	1	5				
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11				
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	2	7		
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

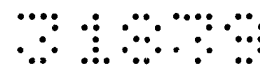


Az alapján véve homológ proteinekét úgy jellemezzük, mint amelyek egy vagy több aminosav helyettesítéssel, delécióval vagy addícióval rendelkeznek. Ezek a változások előnyösen kisebb mértékűek, azaz olyan konzervatív helyettesítések, melyek jelentősen nem befolyásolják a protein feltekeredését vagy aktivitását (lásd a 2. táblázatot); kis deléciók, tipikusan 1-30 aminosavat tartalmazók; és kis amino- vagy karboxil-terminális extenziók, mint például egy amino-terminális metionin maradék, egy 20-25 maradékot tartalmazó kis kötő peptid, vagy egy a tisztítást elősegítő kis extenzió, mint például egy poli-hisztidin szakasz, egy antigenikus epitóp, vagy egy kötő domén. Lásd általában Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak.

## 2. táblázat

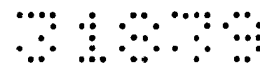
### Konzervatív aminosav helyettesítések

Bázikus:	arginin lizin hisztidin
Savas:	glutaminsav aszparaginsav
Poláros:	glutamin aszparagin
Hidrofób:	leucin izoleucin valin
Aromás:	fenilalanin triptofán tirozin
Kicsi:	glicin alanin szerin threonin metionin



A TPO-ban az esszenciális aminosavak a tudomány e területén ismert eljárásoknak megfelelően azonosíthatók, mint például hely irányította mutagenezissel, vagy alanin-scanning mutagenezissel (Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085, 1989). Ez utóbbi technikában, egyedüli alanin mutációkat juttatunk a molekula minden maradékához és a kapott mutáns molekulákat biológiai aktivitásukra teszteljük (például receptor kötésre, *in vitro* vagy *in vivo* szaporodási aktivitásra), azon aminosav maradékok azonosítása céljából, melyek kulcsfontosságúak a molekula aktivitása szempontjából. A ligandum-receptor kölcsönhatások helyei szintén meghatározhatók a kristály szerkezet analizisével amint azt olyan technikákkal, mint a nukleáris mágneses rezonancia, krisztallografia vagy fotoaffinitási jelöléssel meghatározható. Lásd, például de Vos et al., *Science* 255:306-312; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992.

Általában, feltételezzük, hogy a citokinek négy-alfa hélix szerkezetűek, az első és a negyedik hélix a legfontosabb a ligandum-receptor kölcsönhatásban és a család tagjai közül a legerősebben konzervált. A 19. számú szekvenciában bemutatott humán TPO aminosavat tekintve a citokin szekvenciák egymásutánisága azt sugallja, hogy ezek a hélixek a 29-es és 53-as, 80-as és 99-es, 108-as és 130-as és a 144-es és 168-as aminosav maradékok által vannak sorrendben összekötve (a határok  $\pm 4$  maradék). Az egér helix határok (2. számú szekvencia) és más nem humán TPO-k meghatározhatók a humán szekvenciákkal való egymás mellé állításon keresztül. A TPO más fontos szerkezeti szempontjai közé tartoznak a 2. számú szekvencia 51-es, 73-as, 129-es és 195-ös pozíciójánál található cisztein maradékok (a 19. számú szekvencia 28-as, 50-es, 106-os és 172-es maradékainak felelnek meg).



Továbbá, a jelen találmány proteinjai (vagy ezek polipeptid fragmentjei) más bioaktív molekulákhoz csatlakoztathatók, különösen más citokinekhez több-funkciós molekulák létrehozása céljából. Például a thrombopoietin C-terminális doménje csatlakoztatható más citokinekhez azok biológiai tulajdonságainak vagy a termelés hatékonyságának fokozása céljából. A thrombopoietin molekula úgy tűnik két doménből áll. Az első, megközelítően 150 aminosavból álló (amino-terminális) domén méretben hasonló és szerkezeti hasonlóságokkal rendelkezik az eritropoietinnel valamint más hematopoietikus citokinekkal. Az első domén után következik a második, körülbelül 180 aminosavból álló domén, mely szignifikánsan eltérő szerkezetű az adatbázisban szereplő többi ismert protein szerkezettel. Ez a második domén erősen gazdag N-kötődésű glikozilációs helyekben, valamint szerin, prolin és threonin maradékokban, melyek az O-kötődésű glikozilációs helyek fémjelzői. Ez a meglehetősen magas szénhidrát tartalom azt sugallja, hogy ez a domén szerepet játszik a hidrofób első domén viszonylag nagyobb oldékonyságának megvalósításában. Kísérleti bizonyítékok állnak rendelkezésre, melyek azt jelzik, hogy a második doménnel kapcsolatos szénhidrát részt vesz a megfelelő intracelluláris összeépülésben, valamint a protein szekréciójában annak bioszintézise során. A második domén részt vehet az első domén proteolitikus lebontás elleni stabilizálásban és/vagy a molekula in vivo felezési idejének meghosszabbításában, ezenkívül a protein specifikus aktíválásának vagy biológiai jel transzmittanciájának lehetővé tételében.

A jelen találmány így egy sor új, hibrid molekulát biztosít, melyekben a TPO második doménje egy második citokinhez kapcsolódik. Előnyben részesül, ha a TPO C-terminális doménje a második citokin C-terminusához kapcsolódik. A kapcsolódást előnyösen úgy végezzük, hogy DNS szinten hasítást végzünk a kiméra molekula expressziójának lehetővé tétele céljából rekombináns termelési rendszerekben. A

kapott molekulákat ezután olyan tulajdonságokra vizsgáljuk, mint fokozott oldékonyság, fokozott stabilitás, megnőtt tisztulási felezési idő, vagy fokozott expressziós és szekréción szintek, valamint farmakodinamika. Az ilyen kiméra citokinek specifikus példái közé tartoznak azok, melyekben a TPO második doménje az EPO, G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-3 vagy IL-11 C-terminusához kötődnek. Ahogy azt fent említettük, ezt kényelmesen DNS fúzióval hajtjuk végre. Ezután a fuzionált cDNS-t egy megfelelő expressziós vektorba szubklónozzuk, majd gazdasejtekbe vagy a hagyományos módszereknek megfelelő organizmusokba transzformáljuk vagy transzfektáljuk. A kapott fúziós proteineket hagyományos kromatográfiás tisztítási technikákat használva tisztítjuk (például kromatográfiás technikákkal), valamint tulajdonságaikat a természetes, nem fuzionált, szülői citokinek tulajdonságaival vetjük össze. Az ilyen hibrid molekulák továbbá tartalmazhatnak további aminosav maradékokat (például egy polipeptid kötőt) a proteinek vagy polipeptidek alkotórészei között.

A fent leírt hematopoietikus proteinen túl, a jelen találmány magába foglalja ezen proteinek és a fragmenteket kódoló izolált polinukleotid molekulák fragmentjeit is. Különösen figyelemre méltóak azok a fragmentek, melyek legalább 10 aminosav hosszúságúak és melyek egy MPL receptorhoz kötődnek, valamint az ilyen polipeptideket kódoló legalább 30 nukleotid hosszúságú polinukleotid molekulák. Az ilyen típusú polipeptidek ismert szkrínelési módszerekkel azonosíthatók, mint például az intakt protein emésztésével, vagy kis átfedő polipeptidek vagy polinukleotidok szintetizálásával (ezen utóbbi expresszálásával), tetszés szerint a fent leírt szerkezeti analízishez való technikákkal együtt. A kapott polipeptideket ezután azon képességükre teszteljük, hogy képesek-e specifikusan az MPL receptorhoz kötődni és a sejt szaporodást stimulálni az MPL receptoron keresztül. A kötődést hagyományos módszerekkel határozzuk meg, mint például a Klotz (Science



217:1247, 1982 "Scatchard analízis") által leírt módszert használva. Röviden, egy radioaktív jelölésű teszt polipeptidet inkubálunk az MPL receptort hordozó sejtekkel jelölés nélküli TPO növekvő koncentrációinak jelenlétében. A sejthez kötött, jelölt polipeptidet a szabad jelölt polipeptidtól centrifugálással elkülönítjük Ftalát olajon keresztül. A teszt polipeptid kötődési affinitását úgy határozzuk meg, hogy ábrázoljuk a kötött:szabad jelölés arányát az ordinátán a kötött jelöléssel szemben az abszcisszán. A kötődési specifitást úgy határozzuk meg, hogy a TPO-tól eltérő citokinekkal szembeni kompetícióját meghatározzuk. A receptor kötődés meghatározható a teszt vegyület immobilizált MPL receptorral való kicsapatásával (vagy ennek ligandum kötő extracelluláris doménjével). Röviden, a receptort vagy ennek egy részét egy oldhatatlan támasztékon immobilizáljuk. A teszt vegyületet jelöljük, például a gazdasejtek metabolikus jelölésével, egy rekombináns teszt vegyület esetében, vagy hagyományosan in vitro jelölési módszerekkel (például radio-jodinálással). Ezután a jelölt vegyületet az immobilizált receptorral vegyítjük, a nem kötődő anyagot eltávolítjuk és a kötött, jelölt vegyületet detektáljuk. A számos jelölés detektálására szóló módszerek jól ismertek a tudomány e területén. A szaporodás stimulálását hagyományosan határozzuk meg MTT kolorimetriás vizsgálatot használva MPL receptort hordozó sejtekkel. A polipeptideket vizsgáljuk aktivitásukra különböző koncentrációkban, tipikusan 1 nM - 1 mM határok között.

Az 50 vagy több maradékot, előnyösen 100 vagy több, még előnyösebben körülbelül 140 vagy még több maradékot tartalmazó nagyobb polipeptideket egészen a teljes érett protein méretéig szintén biztosítja a találmány. Például, a 2. számú szekvenciában bemutatott 51-195 (ezeket is beleértve) maradékokat magába foglaló aminosav szekvencia vagy a 19. számú szekvenciában bemutatott 28-172 (ezeket is beleértve) maradékokat magába foglaló aminosav szekvencia analízise és modellezése azt sugallja, hogy a molekulák ezen részei citokin-szerű domének,



melyek képesen az ön-összeépülésre. Szintén érdeklődésre tartanak számot azok a molekulák, melyek ezt a mag citokin-szerű domént valamint a primer transzlációs termék egy vagy több szegmentjét vagy doménjét foglalják magukba. Így az egyéb érdeklődésre számot tartó polipeptideket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat

Egér TPO (2. számú szekvencia)

- Cys (51-es maradék)--Val (196 maradék)
- Cys (51)--Pro(206)
- Cys (51)--Thr (379)
- Ser (45)--Cys (195)
- Ser (45)--Val (196)
- Ser (45)--Pro (206)
- Ser (45)--Thr (379)
- Met (24)--Cys (195)
- Met (24)--Val (196)
- Met (24)--Pro (206)
- Met (24)--Thr (379)
- Met (1)--Cys (195)
- Met (1)--Val (196)
- Met (1)--Pro (206)
- Met (1)--Thr (379)

Humán TPO (19. számú szekvencia)

- Cys (28)--Val (173)
- Cys (28)--Arg (175)
- Cys (28)--Gly (353)
- Ser (22)--Cys (172)
- Ser (22)--Val (173)
- Ser (22)--Arg (175)
- Ser (22)--Gly (353)
- Met (1)--Cys (172)
- Met (1)--Val (173)
- Met (1)--Arg (175)
- Met (1)--Gly (353)



A tudomány e területén képzett szakember számára felismerhető, hogy a molekulák köztes formái (például a 2. számú szekvencia 196-206 maradékok közötti C-terminusai vagy a 19. számú szekvencia 22-28 maradékai közötti N-terminusai) szintén érdeklődésre tartanak számot, mint egy vagy több aminosav helyettesítéssel, delécióval, inzertációval vagy N- vagy C-terminális extenziókkal (ahogy azt korábban leírtuk) rendelkező polipeptidek. Így a jelen találmány biztosít legalább 10, előnyösen legalább 50, még előnyösebben legalább 100 és legelőnyösebben legalább 140 aminosav maradékból álló hematopoiitikus polipeptideket, ahol az említett polipeptidek alapján véve homológok a 2. számú vagy a 19. számú szekvenciák hasonló méretű polipeptidjeivel.

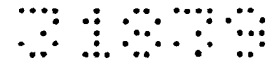
A jelen találmány proteinjei előállíthatók génszintézisileg manipulált sejtekben, hagyományos technikáknak megfelelően. A megfelelő gazdasejtek azok a sejt típusok, melyek egy exogén DNS-sel transzformálhatók, vagy transzfektálhatók és tenyésztésben szaporíthatók, ideértve a baktériumokat a fonalas gomba sejteket, valamint a magasabbrendű eukarióta sejtek tenyészetét. A klónozott DNS molekulák manipulálására szolgáló technikákat és az exogén DNS számos gazdasejtbe való bejuttatásának technikáját Sambrook et al. írták le (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, és Aysabel et al., *ibid.*, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak.

Általában a jelen találmány egy proteint kódoló DNS szekvencia működőképesen kapcsolódik egy transzkripciós promóterhez és terminátorhoz egy expressziós vektoron belül. A vektor általában tartalmaz egy vagy több szelektálható markert és egy vagy több replikációs origót, bár a tudomány e területén képzett szakemberek felismerik, hogy bizonyos rendszerekben a szelektálható markerek egy külön vektoron biztosíthatók, és az exogén DNS replikációja úgy biztosítható, hogy

azt a gazdasejt genomjába juttatjuk be. A promóterek, terminátorok, szelektálható markerek, vektorok és más elemek szelekciója rutin tervezés kérdése a tudomány e területén képzett szakemberek számára. Számos ilyen elem került leírásra az irodalomban és beszerezhető a kereskedelmi ellátóktól.

Hogy egy a jelen találmány szerinti proteint gazdasejtek egy szekrációs útjára irányítsunk egy szekrációs jel szekvenciát (vezető szekvenciaként, prepro szekvenciaként vagy pre szekvenciaként is ismert) biztosítunk az expressziós vektorban. A szekrációs jel szekvencia a helyes olvasási keretben csatlakozik a jelen találmány proteinjét kódoló DNS molekulához. A szekrációs jel szekvenciák általában a kérdéses proteint kódoló DNS szekvencia 5' irányában helyezkedik el, bár bizonyos jel szekvenciák máshol is pozicionálhatók a kérdéses DNS szekvenciában (lásd például Welch et al., 5,037,743 számú US szabadalom; Holland et al., 5,143,830 számú US szabadalom). A szekrációs jel szekvencia lehet olyan, mely normálisan kapcsolódik a jelen találmány egy proteinjével, vagy származhat egy másik szekretált proteint kódoló génből.

Az élesztőgomba sejtek, különösen a *Saccharomyces* nemzetség sejtjei előnyben részesített gazdák a jelen találmányban való alkalmazáshoz. Az élesztőgombák exogén DNS molekulákkal való transzformálására szolgáló módszerek, valamint az ezekből történő rekombináns protein előállítására szolgáló módszerek például a Kawasaki 4,599,311 számú US szabadalomban; a Kawasaki et al., 4,931,373 számú szabadalomban; a Brake, 4,870,008 számú US szabadalomban; Welch et al., 5,037,743 számú szabadalomban; valamint Murray et al., 4,845,075 számú szabadalomban került leírásra, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. A transzformált sejteket a szelektálható markerek segítségével fenotípus alapján szelektáljuk, általában drog rezisztencia alapján, vagy azon képességük alapján, hogy képesek bizonyos tápanyagok hiányában is



szaporodni (például leucin hiányában). Az élesztőgombákban való alkalmazáshoz előnyben részesített vektor rendszer a POT1 vektor rendszer, melyet Kawasaki et al (4,931,373 számú US szabadalom) írtak le, mely lehetővé teszi, hogy a transzformált sejteket glükóz-tartalmú tápközegben szaporítva szelektáljuk. Az élesztőgombák esetén előnyben részesített szekréción jel szekvencia a *S.cerevisiae* MFalfa1 génje (Brake, ibid.; Kurjan et al., 4,546,082 számú US szabadalom). Az élesztőgombákban való alkalmazáshoz a megfelelő promóterek és terminátorok közé tartoznak a glükolitikus enzim gének közé tartozók (lásd például Kawasaki 4,599,311 számú US szabadalmat; Kingsman et al., 4,615,974 számú US szabadalmat; valamint Bitter 4,977,092 számú US szabadalmat, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak), valamint az alkohol dehidrogenáz gének közé tartozók. Lásd a 4,990,446, az 5,063,154, az 5,139,936 és a 4,661,454 számú US szabadalmakat, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. A más élesztőgombákhoz való transzformációs rendszerek, ideértve a *Hansenula polymorpha*, a *Schizosaccharomyces pombe*, a *Kluyveromyces lactis*, a *Kluyveromyces fragilis*, az *Ustilago maydis*, a *Pichia pastoris*, a *Pichia guillermondii* és a *Candida maltosa* jól ismertek a tudomány e területén. Lásd, például Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132:3459-3465, 1986 és Cregg, 4,882,179 számú US szabadalmat.

Más gomba sejtek szintén megfelelő gazdasejtek. Például az *Aspergillus* sejtek felhasználhatók McKnight et al., (4,935,349 számú US szabadalmát, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) által leírt módszernek megfelelően. Az *Acremonium chrysogenum* transzformálására szolgáló módszert Sumino et al (5,162,228 számú US szabadalom) írták le, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak. A *Neurospora* transzformálására szolgáló módszereket Lambvowitz (4,486,533 számú US szabadalom) írta le, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak.

A tenyésztett emlős sejtek szintén előnyben részesített gazdasejtek a jelen találmányon belül. Az exogén DNS molekula emlős gazdasejtbe való bejuttatására szolgáló módszerek közé tartoznak a kalcium foszfát által közvetített transzfektálás (Wigler et al., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52:456, 1973), az elektroporáció (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982) és a DEAE-dextrán által közvetített transzfektáció (Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY. 1987), melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. A rekombináns proteinek tenyésztett emlős sejtekben való termelését például Levinson et al., (4,713,339 számú US szabadalom) Hagen et al., (4,784,950 számú US szabadalom), Palmiter et al., (4,579,821, számú US szabadalom) és Ringold (4,656,134 számú US szabadalom) írták le, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. Az előnyben részesített tenyésztett emlős sejtek közé tartoznak a COS-1 (ATCC CRL 1650), a COS-7 (ATCC CRL 1651), a BHK (ATCC CRL 1632), a BHK 570 (ATCC CRL 10314), a 293-as (ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) és a kínai hörcsög ovarium (például CHO-K1; ATCC CCL 61) sejtvonalak. A további megfelelő sejtvonalak ismertek a tudomány e területén és beszerezhetők olyan deponálóktól, mint az American Type Culture Collection, Rockville Maryland. Általában az erős transzkripció promótereket részesítjük előnyben, mint például az SV-40 vagy a citomegalovírus promótereket. Lásd például a 4,956,288 számú US szabadalmat. Más megfelelő promóterek közé tartoznak a metallothionein génekből származók (4,579,821 és 4,601,978 számú US szabadalmak, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak) és az adenovírus fő késői promóter.

A drog szelekciót általában a tenyésztett emlős sejtek szelektálására használjuk, melyekbe korábban idegen DNS-t inzertáltunk. Az ilyen sejtekre



általában "transzfektánsokként" utalunk. A szelektív anyag jelenlétében tenyésztett valamint a kérdéses gént az utódokba átörökíteni képes sejtekre általában "stabil transzfektánsokként" utalunk. Egy előnyben részesített szelektálható marker egy antibiotikus neomycinnel szemben rezisztenciát kódoló gén. A szelekciót egy neomycin-szerű drog jelenlétében hajtjuk végre, mint amilyen például a G-418 vagy a hasonló drogok. A szelekciós rendszerek felhasználhatók a kérdéses gén expressziós szintjeinek fokozása céljából is, mely folyamatra "amplifikációként" utalunk. Az amplifikációt úgy hajtjuk végre, hogy a transzfektánsokat egy szelekciós anyag alacsony szintjének jelenlétében tenyésztjük, majd a szelekciós anyag mennyiségét növeljük az olyan sejtek szelektálása céljából, melyek a bejuttatott génnek termékeinek magas szintjeit termelik. Egy előnyben részesített amplifikálható szelekciós marker a dihidrofolát reduktáz, mely a metotrexáttal szemben biztosít rezisztenciát. Más drog rezisztencia gének (például a higromycin rezisztencia, a multi-drog rezisztencia, a puromycin acetil-transzferáz) szintén felhasználhatók.

Más magasabbrendű eukarióta sejtek szintén felhasználhatók gazdákként, ideértve a rovar sejteket, a növényi sejteket és a madarak sejtjeit. A rovar sejtek transzformálásáról és a bennük történő idegen proteinek termeléséről Guarino et al (5,162,222 számú US szabadalom), Bang et al., (4,775,624 számú US szabadalom) és a WO 94/06463 számú WIPO közlemény számolnak be, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. Az *Agrobacterium rhizogenes* vektorként való felhasználásáról gének növényi sejtekben való expresszáálásáról Sinkar et al., (J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987) számoltak be.

A jelen találmány megvalósításához előnyben részesített prokarióta gazdasejtek az *Escherichia coli* baktérium törzseinek sejtjei, bár *Bacillus* és más nemzetségek szintén hasznosak lehetnek. Az ezen gazdák transzformálásához és a bennük klónozott idegen DNS szekvenciák expresszáálásához való technikák jól

ismertek a tudomány e területén (lásd Sambrook et al., ibid.) Ha a proteineket baktériumban, mint például *E. coli*-ban expresszáljuk a protein visszamaradhat a citoplazmában, tipikusan oldhatatlan granulummokként, vagy a periplazmás térbe kerülhet egy bakteriális szekrécións szekvencia révén. Az első esetben a sejteket lizáljuk és a granulumokat kinyerjük és denaturáljuk például guanidin izotiocianáttal. A denaturált proteint ezután újra hajtogatjuk a denaturáns hígításával. A második esetben a protein a periplazmás térből oldható és funkcionális formában nyerhető ki ha a sejteket összetörjük (például szonikálással vagy ozmózisos sokkal) a periplazmás tér tartalmának kiszabadítása és a protein kinyerése céljából.

A transzformált vagy transzfektált gazdasejteket hagyományos eljárásoknak megfelelően tenyésztjük egy tápanyagot és a választott gazdasejt szaporodásához szükséges más alkotórészeket tartalmazó tápközegben. Számos megfelelő tápközeg, ideértve a határozott tartalmú tápközéget és a komplex tápközéget, ismert a tudomány e területén, és ezek közé tartoznak általában a szén forrás, a nitrogén forrás, az esszenciális aminosavak, vitaminok és ásványi anyagok. A tápközégek szükség szerint tartalmazhatnak olyan alkotórészeket is, mint a növekedési faktorok, vagy szérumot. A szaporodási tápközeggel általában olyan sejtekre szelektálunk, melyek tartalmazzák az exogén módon hozzáadott DNS-t, például drog szelekcióval, vagy egy esszenciális tápanyag hiányával, melyet az expressziós vektor által hordozott szelektálható markerrel egészítünk ki vagy a gazdasejtbe ko-transzfektáljuk.

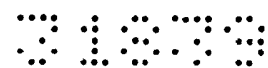
A jelen találmányon belül, transzgenikus állat technológia is alkalmazható a TPO termelés megvalósítása céljából. Előnyben részesül ha a proteint egy gazda nőstény állat tejmirigyében termeltetjük. A tejmirigyben való expresszió, valamint a kérdéses protein tejbe való ezt követő szekrécións számos más forrásból származó protein izolálásával kapcsolatos nehézséget megold. A tej könnyen összegyűjthető,



nagy mennyiségben áll rendelkezésre és biokémiai szempontból jól jellemzett. Továbbá, a fő tej proteinek nagy koncentrációban vannak jelen a tejben (körülbelül 1-15 g/liter).

Kereskedelmi szempontból világosan preferálható ha olyan fajt használunk gazdának, mely nagy tejhozamot ad. Míg a kisebb állatok, mint az egér és a patkány felhasználhatók (és előnyben részesülnek az elmélet igazolásának stádiumában) a jelen találmányon belül előnyben részesül a háziállatok felhasználása, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a sertéseket, a kecskéket a juhokat és a szarvasmarhákat. Különösen a juhok részesülnek előnyben olyan tényezőknek köszönhetően, mint a fajjal kapcsolatos korábbi transzgenizmus, a tejhozam, költségek valamint a juh tej összegyűjtéséhez könnyen beszerezhető eszközök. Lásd a WO 88/00239 számú WIPO közzétételt a gazda faj kiválasztásával kapcsolatos tényezők összevetése céljából. Általában kívánatos egy olyan gazda állatot kiválasztani, melyet már tenyésztés alá vettek a tejtermeléshez, mint például az East Friesland juhot, vagy a transzgenikus vonal tenyésztésével tejelő állományt létrehozni egy későbbi időpontban. Bármilyen eseményben ismert, jó egészségi állapotú állatokat kell használni.

A tejmirigyben való expresszió megvalósításához egy tej protein génből származó transzkripciós promótert használunk. A tej protein gének közé tartoznak azok, melyek a kazeineket (lásd az 5,304,489 számú US szabadalmat, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak), a beta-laktoglobulint, az alfa-laktalbumint és a savó savas proteint kódolják. A beta-laktoglobulin (BLG) promóter részesül előnyben. A juh beta laktoglobulin gén esetében a gén 5' szomszédos szekvenciájának legalább 406 bázispár hosszúságú proximális régióját használjuk általában, bár az 5' szomszédos szekvencia nagyobb részei is felhasználhatók, egészen 5 kilobázispár méretig, ezek részesülnek előnyben, mint például az 5'



szomszédos promótert és a beta-laktoglobulin gén nem-kódoló részét tartalmazó körülbelül 4,25 kilobázispár hosszúságú DNS. Lásd, Whitelaw et al., *Biochem J.* 286: 31-39, 1992. Más fajokból származó DNS promóterek hasonló fragmentjei is felhasználhatók.

A beta-laktoglobulin gén más régiói szintén beépíthetők a szerkezetekbe, mivel a gén genom régiói is expresszálhatók. A tudomány e területén elfogadott, ha a szerkezetből hiányoznak az interferonok, például gyengén expresszálnak az ilyen DNS szekvenciákat tartalmazó szerkezetekhez viszonyítva (lásd Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:836-840, 1988; Palmiter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:478-482, 1991; Whitelaw et al., *Transgenic Res.* 1:3-13, 1991; WO 89/01343 és WO 91/02318 számú szabadalmak). Ebből a szempontból, általában előnyben részesül, ahol lehetséges, ha a kérdéses proteint vagy polipeptidet kódoló gén natív intronjának egészét vagy egy részét tartalmazó genom szekvenciák kerülnek felhasználásra, így legalább néhány intron, például a beta-laktoglobulin génből származó, további inkluziója előnyben részesül. Egy ilyen régió egy olyan DNS szegment, mely biztosítja az intron hasítást és az RNS poliadenilálást a juh beta-laktoglobulin gén 3' nem-kódoló régiójából. Ha egy gén természetes 3' nem-kódoló szekvenciáira cseréljük ez a juh beta-laktoglobulin szegment a kérdéses protein vagy polipeptid expressziós szintjeit fokozni és stabilizálni képes. Más megvalósulásokban a TPO szekvencia iniciációs ATG kódonját közrefogó régiót egy tej specifikus protein génből származó megfelelő szekvenciákra cseréljük. Az ilyen helyettesítés egy feltételezett szövet-specifikus iniciációs környezetet biztosít az expresszió fokozására. Lehetőség van a teljes TPO pre-pro szekvencia és az 5' nem kódoló szekvenciák olyan szekvenciákkal való helyettesítésére mint például a BLG gén, bár kisebb régiók is helyettesíthetők.



A TPO tranziens állatokban való expressziójához egy a TPO-t kódoló DNS szegmentet működőképesen kapcsolunk további olyan DNS szegmentekhez, melyek szükségesek ennek expressziójához expressziós egységek létrehozása céljából. Az ilyen további szegmentek közé tartoznak a korábban említett promóter, valamint olyan szekvenciák, melyek a transzkripció terminációját és az mRNS poliadenilációját biztosítják. Az expressziós egységek magukba foglalnak egy a TPO-t kódoló szegmenthez működőképesen kapcsolódó szekréción jel szekvenciát kódoló DNS szegmentet. A szekréción jel szekvencia lehet egy natív TPO szekréción jel szekvencia, vagy egy másik protein TPO szekréción jel szekvenciája, mint például egy tej proteiné. Lásd például von Heinje, Nuc. Acids. Res. 14:4683-4690, 1986; és Meade et al., 4,873,316 számú US szabadalom, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak.

Az expressziós egységek megszerkesztése a transzgenikus állatokban való felhasználáshoz megvalósítható, ha egy TPO szekvenciát egy hozzáadott DNS szekvenciát tartalmazó plazmidba vagy fág vektorba inzertáljuk, bár az expressziós egység megszerkeszthető ligálások bármilyen szekvenciájával. Különösen megvalósítható egy tej proteint kódoló DNS szegmentet tartalmazó vektor biztosítása egy TPO polipeptiddel, így egy olyan gén fúziót hozunk létre, mely magába foglalja a tej protein gén expressziós kontrol szekvenciáit. Bármely esetben az expressziós egységek plazmidokba vagy más vektorokba való klónozását elősegíti a TPO szekvencia amplifikálása. Az amplifikációt megvalósíthatjuk egy bakteriális (például *E. coli*) gazda sejtekben, így a vektorok tipikusan magukba foglalnak egy replikációs origót és egy bakteriális gazdasejtben funkcionális szelektálható markert.

Ezután az expressziós egységet a kiválasztott gazda faj megtermékenyített petesejtjébe (ideértve a korai stádiumú embriót) juttatjuk. A heterológ DNS

bejuttatása elvégezhető számos módszer valamelyikével, ideértve a mikroinjektálást (például 4,873,191 számú US szabadalom) retrovirális infekcióval (Jaenisch, Science 240:1468-1474, 1988) vagy hely irányította integrációval embrionális törzs sejteket (ES) használva (Bradley et al. adtak áttekintést erről, Bio/Technology 10:534-539, 1992). Ezután a petesejtet pszeudoterhes nőtények petevezetőjébe vagy méhébe implantáljuk és a vemhesség végéig fejlődni hagyjuk. Az ivarvonalukban a bejuttatott DNS-t hordozó utódok a DNS-t utódaikra át tudják örökíteni a normális Mendeli módon, lehetővé téve egy transzgenikus csorda létrehozását.

A transzgenikus állatok általános létrehozásának módszere a tudomány e területén ismert. Lásd például Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simon et al., Bio/Technology 6: 179-183, 1988; Wall et al., Biol. Reprod. 32: 645-651, 1985; Buhler et al., Bio/Technology 8:140-143, 1990; Ebert et al., Bio/Technology 9:835-838, 1991; Krimpenfort et al., Bio/Technology 9:844-847, 1991; Wall et al., J. Cell Biochem. 49:113-120, 1992; 4,873,191 számú és 4,873,316 US szabadalmak; WO 88/00239 számú WIPO szabadalom, WO 90/05188, WO 92/11757 és GB 87/00458 számú szabadalmak melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. Az emlősökbe és ivarvonalukba való idegen DNS szekvenciák bejuttatásának technikáit eredetileg egerekre fejlesztették ki. Lásd például Gordon et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980; Gordon and Ruddle, Science 214: 1244-1246, 1981; Palmiter and Brinster, Cell 41:343-345, 1985; Brinster et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442, 1985; és Hogan et al., (ibid.)). Ezeket a technikákat ezután nagyobb állatokhoz is adaptáltuk, ideértve a gazdasági haszonállatokat (lásd például WO 88/00239, WO 90/05188 és WO 92/11757 számú WIPO szabadalmak; és Somons et al., Bio/Technology 6:179-183, 1988). Összefoglalva, a transzgenikus egerek vagy haszonállatok létrehozásában használt leghatékonyabb eljárás során

több száz kérdéses lineáris DNS molekulát injektálunk egy megtermékenyített petesejt egyik pre-nukleuszába a tudomány e területén standarddó vált technikáknak megfelelően. A DNS zigóta citoplazmába való injektálása szintén alkalmazható.

A transzgenikus növényekben való termelés is megvalósítható. Az expresszió általánosítható vagy egy adott szerve, például a gumóra irányítható. Lásd Hiatt, Nature 344:469-479, 1990; Edelbaum et al., J. Interferon Res. 12:449-453, 1992; Sijmons et al., Bio/Technology 8:217-221, 1990; és a 255,378 számú Európai Szabadalmi Alkalmazás).

A jelen találmány szerint előállított TPO-t a tudomány e területén általánosan ismert módszerek szerint tisztítjuk, mint például affinitási tisztítással és a méretre, töltésre, oldékonyságra és a protein más tulajdonságaira alapuló szeparálással. Ha a proteint tenyésztett emlős sejtekben termeljük, előnyben részesül, ha a sejteket szérum-mentes tápközegben tenyésztjük a fertőző protein mennyiségének korlátozása céljából. A tápközéget összegyűjtjük és frakcionáljuk. A frakcionálás előnyben részesített módszerei közé tartoznak a concanavalin A-n, vagy más lektinen végzett affinitás kromatografia, így felhasználjuk a proteinben jelen levő szénhidrátot. A proteinek tisztíthatók egy immobilizált MPL receptor vagy ennek egy ligandum kötő részletének felhasználásával, vagy egy affinitási elem alkalmazásán keresztül (például polihisztidin, a P anyag vagy más polipeptid vagy protein segítségével, mellyel szemben egy antitest vagy egy másik specifikus kötő anyag beszerezhető). Egy specifikus hasítási hely biztosítható a kérdéses protein és az affinitási elem között.

A jelen találmány proteinjei terápiásan használhatók szükség szerin a csontvelőben levő sejtek szaporodásának fokozására, például a cytopenia kezelésére, mint például amit az aplastikus anemia, myelodisplastikus szindrómák, a kemoterápiák vagy a veleszületett cytopeniák indukálnak; a csontvelő



transzplantációs betegek esetében; a perifériás vérsejt transzplantációs betegek esetében; és olyan állapotok kezelésére, melyek csontvelő elégtelenséget okoznak, mint például a myelodysplastikus szindróma. A proteinek hasznosak a vérlemezkek termelésének fokozásában is, mint például a thrombocytopenia kezelésében. A thrombocytopenia betegségek egy széleskörű csoportjával és klinikai helyzetekkel kapcsolatos, melyek egyedül hathatnak vagy melyek az állapotot együttesen hozzák létre. A csökkent vérlemezke szám eredhet például a vérlemezke termelés hibájából (például a veleszületett rendellenességeknek, mint a Fanconi szindrómának, a thrombocytopeniás hiányos radii szindrómának, Wiskott Aldrich, May Hegglin anomáliának, Bernard-Soulier szindrómának, Menneapolis szindrómának, Epstein szindrómának, Montreal vérlemezke szindrómának és az Eckstein szindrómának köszönhető), az abnormális vérlemezke eloszlásból, az erős transzfúziók következtében bekövetkező hígítási veszteségeknek, abnormális vérlemezke pusztulásból, vagy a hiperspleniás betegek lépének abnormális sequestrációjából (például a cirrhosisnak vagy vértolulósos szív elégtelenségnek köszönhető). Például a rák terápiában alkalmazott kemoterápiás drogok (gyógyszerek) gátolhatják a vérlemezke őssejtek kifejlődését a csontvelőben, és a kialakult thrombocytopenia korlátozza a kemoterápiát és esetleg transzfúziót tesz szükségessé. Továbbá, bizonyos rosszindulatú betegségek rontják a vérlemezkek termelését és a vérlemezkek eloszlását. A rosszindulatú sejtek elpusztításához használt sugárterápia elpusztítja a vérlemezke őssejteket is. A thrombocytopenia bekövetkezhet a drogok által indukált vérlemezke autoimmun rendellenességeiből is, a születés előtti alloimmunitásból, a vérlemezke transzfúziós alloimmunitásból és a virális (ideértve a HIV-et is) fertőzésből. A jelen találmány proteinjai csökkenthetik vagy megszüntethetik a transzfúzió szükségességét, így csökkentve a vérlemezke alloimmunitás előfordulását. A vérlemezkek abnormális lebomlása eredhet: (1) a



fokozott vérlemezke fogyás a vaszkuláris transzplantumokban vagy a traumás szövetekben; vagy (2) a drog-indukálta thrombocytopeniával, idiopátikus thrombocytopeniás purpurával (ITP), autoimmun betegségekkel, hematológias rendellenességekkel, mint például a leukémia és limfoma, vagy a metasztatikus rákok - ideértve a csontvelőt - kapcsolatos immun mechanizmusokból. A jelen találmány proteinjéhez való más indikációk közé tartoznak az aplasztikus anémia és a drog-indukálta velő szupresszió, melyek például a kemoterápiából vagy a HIV fertőzés AZT-vel való kezeléséből erednek.

A thrombocytopenia fokozott vérzésként manifesztálódik, mint például az orrszem területén vagy az emésztőcsatornában bekövetkező nyálkahártya vérzésekkel valamint a sebekből, fekélyekből vagy injektálási helyekből való szivárgásban.

Gyógyszerészeti használathoz a jelen találmány proteinjeit parenterális, különösen intravénás vagy szubkután alkalmazáshoz formulázzuk, a hagyományos módszereknek megfelelően. Az intravénás alkalmazást nagy adagú injekcióban vagy infúzióban valósítjuk meg melynek tipikus időtartama 1 vagy több óra. Általában a gyógyszerészeti készítmények egy hematopoiétikus proteint tartalmaznak egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval - mint amilyen a sóoldat, pufferelt sóoldat, 5 % dextróz vízben, vagy más hasonlók - együtt. A készítmények továbbá tartalmazhatnak egy vagy több hatásjavítót, tartósítószer, oldószer, pufferoló anyagot, albumint a fiola felszínén való protein veszteség kivédésére, stb. Továbbá, a jelen találmány hematopoiétikus proteinjei vegyíthetők más citokinekkal, különösen a korán ható citokinekkal, mint például az őssejt faktorra, IL-3-mal, IL-6-tal, IL-11-gyel vagy GM-CSF-fel. Egy ilyen kombinációs terápia alkalmazásakor a citokinek egy egyedüli készítményben kombinálhatók, vagy külön készítményben alkalmazhatók. A készítmény előállításának módszerei jól ismertek a tudomány e területén, és például a Remington's Pharmaceutical Sciences c. műben Gennaro



ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990 került leírásra mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak. A terápiás dózisok általában a 0,1 - 100 µg/beteg testsúly kg/nap határok közötti, előnyösen 0,5-20 µg/kg/nap, mely esetben a pontos dózisokat az orvos határozza meg az elfogadott standardeknek megfelelően, figyelembe véve a kezelendő betegségi állapot természetét és súlyosságát, a beteg jellemzőit, stb. A dózis meghatározása a tudomány e területén átlagosan képzett szakember számára ismert. A proteineket általában 28 napig terjedő időtartam alatt adjuk a kemoterápiát követően, vagy a csontvelő transzplantáció után vagy addig, míg a vérlemezke szám meghaladja a 20000/mm<sup>3</sup>, előnyösen az 50000/mm<sup>3</sup> értéket. Még gyakrabban a proteineket egy hétig vagy rövidebb ideig adjuk egytől három napig. Általában a TPO gyógyszerészetileg hatékony mennyisége egy olyan mennyiség, mely klinikailag hatékony növekedést okoz a limfoid vagy mieloid őssejtek szaporodásában és/vagy differenciálódásában, ami az érett sejtek (például vérlemezkek vagy neutrofilek) fokozott keringési szintjében mutatkozik meg. Így a vérlemezke rendellenességek kezelését addig folytatjuk, amíg a vérlemezke szám eléri a legalább 20000/mm<sup>3</sup>, előnyösen az 50000/mm<sup>3</sup> számot. A jelen találmány proteinjei alkalmazhatók más citokinekkal együtt is, mint például az IL-3-mal, 6-tal és 11-gyel, őssejt faktorral; eritropoietinnel; G-CSF-fel és GM-CSF-fel. A kombinált terápia étrendjében az egyéb citokinek napi dózisa általában a következő: EPO, nagyobb vagy egyenlő 150 U/kg; GM-CSF, 5-15 µg/kg; IL-3, 1-5 µg/kg; és G-CSF 1-25 µg/kg. Az EPO-val történő kombinált terápia például az alacsony EPO szintekkel együttjáró anemiás betegek esetében javasolt.

A jelen találmány proteinjei értékes eszközök a hematopoiitikus sejtek differenciálódásának és fejlődésének in vitro tanulmányozásában, mint például a sejt differenciálódás megvilágításában és az érett sejtek leszármazásának

meghatározásában, valamint proliferatív anyagként használható a sejtenyészetekben.

A jelen találmány proteinjei felhasználhatók ex vivo is például autológ velő tenyészetekben. Röviden, kemoterápia előtt egy betegből eltávolítjuk a csontvelőt és TPO-val kezeljük, tetszés szerint egy vagy több egyéb citokinnel kombinációban. A kezelt velőt ezután visszajuttatjuk a betegbe a kemoterápia után a velő felépülés felgyorsítása céljából. Továbbá, a jelen találmány proteinjei felhasználhatók a velő vagy perifériás vér leszármazott (PBPC) sejtek ex vivo expansziójához is. A kemoterápiás kezelés előtt a velő a törzssejt faktorra (CSF) stimulálható vagy G-CSF-fel, hogy a korai leszármazott sejteket a perifériás vérkeringésbe juttassuk. Ezek a leszármazott sejtek összegyűjthetők és koncentrálnak a perifériás vérből majd tenyésztésben TPO-val kezelhetők tetszés szerint egy vagy több egyéb citokinnel együtt, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül az SCF-et, a G-CSF-et, az IL-3-at, a GM-CSF-et, az IL-6-ot vagy az IL-11-et, hogy nagy sűrűségű megakariocita tenyészetekké differenciálódjanak és szaporodjanak, melyek ezután visszajuttathatók a betegbe a magas dózisú kemoterápia után.

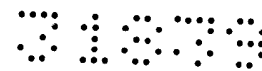
A jelen találmány egy proteinjének egy epitópjához kötődő antitesteket szintén biztosítunk. Az ilyen antitestek a tudomány e területén ismert módszerekkel hozhatók létre. A nem-humán, monoklonális antitestek termelése jól ismert és például megvalósítható egy állat, például egy egér vagy patkány, nyúl, kecske, birka vagy tengerimalac egy rekombináns vagy szintetikus TPO-val vagy ennek egy szelektált polipeptid fragmentjével való immunizálásával. Előnyben részesül, ha az állatot egy nagy tisztaságú proteinnel vagy polipeptid fragmenttel immunizáljuk. Az is előnyben részesül, ha a proteint vagy a polipeptidet egy hatásjavítóval mint például a Freund-féle hatásjavítóval együtt alkalmazzuk, az immun válasz fokozása céljából. Bár egy antigén egy egyedüli injektálása is elegendő lehet az antitest termelés



indukálásához az állatban, általában előnyben részesül, ha a kezdeti nagy injekciót egy vagy több emlékeztető injekció követi néhány hét - néhány hónap időtartam után. Lásd például Hurrell ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application*, CRC Press inc., Boca Raton, FL, 1982, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak. Ezután vért gyűjtünk az állatból, megalvasztjuk és a szérumból izoláljuk az antitesteket hagyományos módszereket, mint például a sóval történő kicsapatást, az ion cserés kromatográfiát, az affinitás kromatográfiát vagy HPLC-t használva.

A monoklonális antitestek használta különösen előnyben részesül a poliklonális antiszérumokkal szemben. A monoklonális antitestek a könnyű termelés, a specifitás és reprodukálhatóság előnyét nyújtják. A monoklonális antitestek termelésének módszerei jól ismertek a tudomány e területén és például Kohler and Milstein írták le (*Nature* 256:495, 1975 és *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976). Lásd Hurrell, *ibid.*, és Hart 5,094,941 számú US szabadalmat, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. Röviden, az immunizált állatokból antitest termelő sejteket nyerünk, ezeket halhatatlanná tesszük és szkríneljük vagy először szkríneljük a TPO-hoz kötődő antitestek termelésére. A pozitív sejteket ezután halhatatlanná tesszük myeloma sejtekkel való fúzióval. A nem-humán antitestek "humanizálhatók" ismert technikák segítségével. Lásd például a 4,816,397 számú US szabadalmat, a 173,494 és 239400 Európai Szabadalmi Alkalmazásokat, valamint a WO 87/02671 és WO 90/00616 számú WIPO szabadalmakat, melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak. Röviden, humán konstans régiójú géneket csatlakoztatunk megfelelő humán vagy nem-humán változó régiójú génekhez. Például a szülői (nem-humán) monoklonális antitest antigén kötő helyeit (CDR-ek vagy komplementaritást meghatározó régiók) képviselő aminosav szekvenciákat ültetünk át DNS szinten a humán változó régiójú keret szekvenciákba.

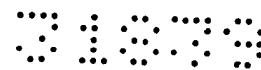




Az ezen technikához való módszerek jól ismertek a tudomány e területén és például Jones et al., (Nature 326:522-525, 1986); Riechmann et al (Nature 322:323-327, 1988) és Queen et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989) írták le. Ezután a kapcsolt géneket gazdasejtekbe transzfektáljuk, melyeket hagyományos eljárásoknak megfelelően tenyésztünk. Az alternatív módszer szerint a monoklonális antitest termelő sejteket klónozott humán konstans régiójú génekkel transzfektáljuk és kiméra antitest géneket hozunk létre homológ rekombinációval. Így lehetőség van a monoklonális antitestek egy humán szerkezet szignifikáns részével való összeépítésére, így olyan antitesteket biztosíthatunk, melyek sokkal megelőbbek a humán betegekben való többszörös alkalmazáshoz.

Az egyláncú antitestek kifejleszthetők egy olyan rekombináns polipeptid expresszióján keresztül, mely általában számos könnyű láncú szekvenciából áll, melyek tipikusan egy polipeptid kötőn keresztül számos nehéz láncú szekvenciához kötődnek. Az egyláncú antitestek termelésének módszerei jól ismertek a tudomány e területén és például Davis et írták le (Bio/Technology 9:165-169, 1991).

A TPO epitópjaihoz kötődő antitestek hasznosak például a csökkent vérlemezke, megakariocita, vagy más vér vagy leszármazott sejt számmal jellemzett betegségek diagnózisában, mely betegségek a leszármazott sejtek szaporodásában vagy differenciálódásában bekövetkezett hiányosságokkal kapcsolatosak. Az ilyen diagnózisokat általában a vér vagy a plazma tesztelésével állapítjuk meg, hagyományos immunvizsgálati módszereket használva, mint például az enzim-kötött immunadszorpciós vizsgálatokat vagy a radioimmun vizsgálatokat használva. Az ilyen típusú vizsgálatok jól ismertek a tudomány e területén. Lásd például Hart et al., Biochem. 29:166-172, 1990; Ma et al., British Journal of Haematology 80:431-436, 1992; és Andre et al., Clin. Chem. 38/5:758-763, 1992. A TPO aktivitáshoz való diagnosztikai vizsgálatok hasznosak lehetnek az olyan beteg populációk



azonosításában, akik leginkább nyerhetnek a TPO terápíából. A TPO elleni antitestek szintén hasznosak a TPO tisztításban, mint például egy antitestet egy szilárd támasztékhoz kötünk, például egy oszlophoz kötött részecske mátrixhoz, majd a proteint tartalmazó oldatot az oszlopon átengedjük. A kötött proteint ezután egy megfelelő pufferrel eluáljuk. Általában a protein az oszlophoz fiziológiai körülmények között kötődik, alacsony ionoerősségű és semleges pH értékhez közeli értéken. Ezután az oszlopot mossuk a nem kötött szennyeződések eluálása céljából. A kötött protein eluálását az ionerősség vagy a pH érték megváltoztatásával, például 3M KSCN (adag, vagy grádiens) vagy alacsony pH értékű citrát pufferrel valósítjuk meg. A 2,5 érték alatti pH értéket általában kerülni kell.

A jelen találmány a megakariociták és a vérlemezkék nagy számának előállítására szolgáló módszereket is biztosít, melyek például cDNS könyvtárak előállítására használhatók. Mivel a vérlemezkék a sérülések helyeire irányulnak úgy véljük, ezek a seb gyógyulás mediátorai, bizonyos körülmények között a patogenezis mediátorai. Így a vérlemezkék és a megakariociták molekuláris biológiájának részletes megértése betekintést engedne a vérlemezke funkciók idevonatkozó homeosztatis és klinikai rendellenességeibe. A jelen találmány proteinjei továbbfejlesztett eszközt biztosítanak a megakariocita vagy vérlemezke cDNS könyvtárak létrehozásához.

Ha rekombináns thrombopoietint állatoknak adjuk vagy tenyésztett lép vagy csontvelő sejtek esetében alkalmazzuk a megakariociták szaporodását indukálja a prekursor sejtekből. A megakariociták és prekursoraik expanziója a TPO kezelés után lehetővé teszi a nagy tisztasú és elegendő számú mRNS izolálását valamint a cDNS könyvtár megszerkesztését. A TPO dózis és az alkalmazási rend beállításával korai vagy teljes érésű megakariociták, valamint a vérlemezkéket aktívan kibocsátó megakariociták szelektíven expandálhatók a primer lép vagy csontvelő sejtekből.

Ennek megfelelően a reprezentatív cDNS könyvtárak úgy szerkeszthetők meg, hogy megfelelnek a megakariopoiesis korai, köztes vagy késői fázisainak.

A kapott cDNS könyvtárak használata sokrétű. Az ilyen könyvtárak felhasználhatók például a különböző vérlemezke rendellenességben szerepet játszó kis mennyiségű proteinek azonosításában és klónozásában. Az a könnyebbség, amivel a betegek megakariocitái kibővíthetők, valamint mRNS-ük analízis céljából izolálható nagyban elősegíti a betegségek molekuláris disszekcióját (boncolását). A könyvtárak ezenkívül új növekedési faktorok és más potenciális terápiás hasznú proteinek klónozásához való források is. A már klónozott hasznos vérlemezke proteinek közé tartoznak a vérlemezke eredetű növekedési faktor (Ross et al., Cell, 26:155-169, 1986); a transzformáló növekedési faktor (Miletich et al., Blood 54:1015-1023, 1979; Roberts and Sporn, Growth Factors 8:1-9, 1993) a vérlemezke eredetű endotheliális sejt növekedési faktor (Miletich et al., Blood 54:1015-1023, 1979) és a PF-4 (Doi et al., Mol. Cell Biol. 7:898-904, 1987; Poncs et al., Blood 69:219-223, 1987). Új növekedési faktorok is azonosíthatók az expressziós cDNS könyvtárak funkcionális szkrínelésével vagy ismert növekedési faktor próbákat felhasználó csökkentett szigorúsági körülmények között végzett hibridizációs szkríneléssel. Az új növekedési faktor izolálása elvégezhető polimeráz lánc reakcióval is, melynek során degenerált primereket használunk az ismert növekedési hormon konzervált régióhoz. Továbbá, egy könyvtár szisztematikus és teljes DNS szekvenálása egy megakariocita cDNS szekvencia adat bázist biztosít. Egy ilyen adatbázis hasznos szekvenciák tárháza számos számítógépes alapú kutatási algoritmus esetében.

A fent leírtak szerint előállított megakariociták felhasználhatók egy protein könyvtár létrehozására is. Ez a protein könyvtár komplementer a cDNS könyvtárral. A protein könyvtárból nyert aminosav szekvencia adatok lehetővé teszik a kérdéses

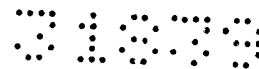


proteineket kódoló cDNS-ek gyors izolálását. A DNS izoláláshoz a primerek megtervezéséhez a protein szekvencia adatok felhasználása kiküszöböl olyan problémákat, melyek a hagyományos könyvtár előállítási módszerekkel kapcsolatban az mRNS viszonylagos bősége következtében jelentkeznek. A protein és a cDNS könyvtárak párosítása kedvez a kérdéses szekvenciák célzott klónozásának.

Egy protein könyvtár állítható elő, a megakariocitákból ismert módszerek segítségével történő proteinek (a teljes proteinek vagy kérdéses frakcióik) extrakciójával, majd a proteinek két-dimenziós gél elektroforézises szeparálásával. Ezután az izolált proteineket in situ triptikus emésztésnek vetjük alá, melyet mikrofuratú HPLC-vel végzett szeparálás követ. A szeparált fragmenteket ezután tömeg spektrometriával analizáljuk. A kapott tömeg profilt egy protein szekvencia adatbázissal szemben vizsgáljuk a protein azonosság következtetése céljából. A nem azonosított peptidek Edman emésztéssel szekvenálhatók.

A cDNS és a protein könyvtárak az új proteinek és az ezeket kódoló szekvenciák értékes forrásai. A vérlemezkékről úgy vélik a seb gyógyulás fontos mediátorai, bizonyos körülmények között a patogeneziséi. Számos fontos vérlemezke proteint azonosítottak és jellemeztek, ideértve a vérlemezke eredetű növekedési faktort, a transzformáló növekedési beta faktort, a vérlemezke eredetű endotheliális sejt növekedési faktort és a 4-es vérlemezke faktort. A többi vérlemezke protein azonosítása és jellemezése kiemelkedően nagy segítséget nyújt a sebgyógyulás és pathogenezis körébe tartozó folyamatok tisztázásában és fontos terápiás anyagok és stratégiák várhatók ezekről.

Ahogy azt a későbbiekben részletesen leírjuk a humán TPO gént a 3q26-os kromoszómában lokalizálják. Ez az információ a humán TPO gén (28. számú szekvencia) szekvenciájával együtt a TPO génben vagy annak expressziójának



szabályozásában bekövetkező örökölt rendellenességek közvetlen diagnózisát teszi lehetővé, genetikai szkríneléssel. Az ilyen rendellenességek közé tartoznak a promóter szekvenciákban bekövetkező változások, melyek az expressziós szint növekedéséhez vagy csökkenéséhez vezetnek, a kódoló vagy a nem-kódoló régiókban bekövetkező kromoszómális transzlokációk, valamint a TPO lókusznál új szabályozó szekvenciák juxtapozíciói. Az alkalmazható diagnosztikai módszerek jól ismertek a tudomány e területén. Például, a legalább 5 nukleotidból, előnyösen 15-30 vagy még több nukleotidból álló primerek vagy hibridizációs próbák megtervezhetők a genom szekvenciából és a kromoszómális abnormalitások vagy az mRNS szintek mérésére használhatók. Számos megfelelő detektálási és mérési módszer ismert a tudomány e területén, ezek közé tartoznak a "Southern" lenyomat technika, a polimeráz lánc reakció (Mullis 4,683,202 számú US szabadalom), és a ligáz lánc reakció (Barany, PCR Methods and Applications 1:5-16, VCold Spring Harbor Laboratory Press, 1991). Például a beteg DNS-e emészthető egy vagy több restriktív enzimmel, majd nitrocellulózra transzferálható egy Southern-féle lenyomat létrehozása céljából. Ezután a lenyomatot a restriktív hely felismerő szekvenciában levő mutációból eredő fragment méret össz-változások detektálása céljából próbáltathatók. Egy másik eljárásban az abnormalis gén szekvenciák analízise, valamint a normális és az abnormalis szekvenciák összehasonlítása teszi lehetővé az olyan primerek megtervezését, melyek az abnormalis (például megzavart vagy transzlokált) gén azonosítására használhatók. A beteg DNS-ét polimeráz lánc reakcióval amplifikáljuk a normális génre vagy egy adott gén átrendeződésre jellemző amplifikációs termékek detektálása céljából.

A jelen találmányt az alábbiakban korlátozás nélkül a következő példákkal szemléltetjük.

## 1. példa

### A humán MPL receptor cDNS-ek izolálása

cDNS-eket kódoló humán MPL-P és MPL-K izoformákat izolálunk humán eritroid leukémia (HEL) sejtekből (Martin and Papayannopoulou, Science 216:1233-1235, 1982) reverz transzkriptáz polimeráz lánc reakcióval (PCR) olyan primereket használva, melyeket a receptorok aminosavját és karboxil terminusait kódoló publikált szekvenciához állítottak elő (Vigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5640-5644, 1992). A templát HEL sejt cDNS-t poli d(T)-szelektált poli(A)<sup>+</sup> RNS-ből szintetizáljuk a ZC5499 primert (3. számú szekvencia) használva. 1 µg/µl koncentrációjú HEL sejt poli(A)<sup>+</sup> RNS 13 µl mennyiségét elegyítjük a 20 pmol/µl koncentrációjú ZC5499 első szál primer (3. számú szekvencia) 3 µl mennyiségével. Az elegyet 65 C° hőmérsékletre hevítjük 4 percre majd jégen lehűtjük.

Az első szál cDNS szintézist úgy indítjuk el, hogy hozzáadunk az első szál pufferből (250 mM Tris-HCl, pH=8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (5x SUPERSCRIPT puffer; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 8 µl mennyiséget, a 100 mM koncentrációjú ditiotreitoltól 4 µl mennyiséget és a dATP-ből, a dGTP-ből, dTTP-ből és az 5-metil-dCTP-ből (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) egyenként 10 mM mennyiséget tartalmazó dezoxinukleotid trifoszfát oldatból 3 µl mennyiséget. A reakció elegyet 45 C° hőmérsékleten 4 percre inkubáljuk, majd az RNS-primer elegyhez hozzáadunk 10 µl mennyiséget a 200 U/µl RN-áz H<sup>-</sup> reverz transzkriptázból (SUPERSCRIPT reverz transzkriptáz; GIBCO BRL). A reakcióelegyet 45 C° hőmérsékleten 1 óráig inkubáljuk, majd 15 percre 50 C° hőmérsékleten. A 10 mM Tris-HCl-t (pH=8,0) és 1 mM EDTA-t tartalmazó TE-ből 60 µl mennyiséget adunk a reakcióelegyhez, ezt egy 400 pólusméretű gél szűrő oszlopon (CHROMA SPIN+TE-400, Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA) végzett kromatográfia követi a feleslegben levő primer eltávolítása céljából.



Az első szál HEL sejt cDNS-t használjuk templátként a humán MPL-P receptor cDNS amplifikálásához a receptor protein aminosavját és karboxil terminusait kódoló megfelelő primereket használva (Vigon et al., *ibid.*). Az egyes primerek magukba foglalnak különböző restrikciós enzim hasítási helyet, mely az amplifikált termék (ZC5746, 4. számú szekvencia, egy Eco RI helyet; a ZC5762, 5. számú szekvencia, egy Xho I helyet tartalmaz) irányított klónozását segíti elő. Egy 100 µl reakcióelegyet kapunk, mely 10 ng templát cDNS-t, az egyes primerekből 50 pmol mennyiséget; az egyes dezoxiribonukleotid trifoszfátokból 200 mM mennyiséget (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.); 1 µl 10x PCR puffert (Promega Corp., Madison, WI), és 10 egység Taq polimerázt (Roche Molecular Systems, Inc. Branchburg NJ.) tartalmaz. A polimeráz láncreakciót 35 cikluson keresztül futtatjuk (1 perc 95 C° hőmérsékleten, 1 perc 60 C° hőmérsékleten és 2 perc 72 C° hőmérsékleten, további egy másodpercet adunk az egyes egymást követő ciklusokhoz), ezt 10 perces 72 C° hőmérsékleten történő inkubálás követi.

Humán MPL-K receptor cDNS-t izolálunk polimeráz láncreakció amplifikációval HEL sejt cDNS-ből a fent leírt MPL-P receptor cDNS-ével azonos módon, azzal az eltéréssel, hogy a ZC5762-öt (5. számú szekvencia) ZC5742-vel (6. számú szekvencia) helyettesítjük. A ZC5742 PCR primer a humán MPL-K cDNS 3' terminusára specifikus és egy Xho I restrikciós helyet foglal magába a klónozás elősegítése céljából.

A reakció termékeket kétszer vonjuk ki fenol:kloroform (1:1) elegyével, majd egyszer kloroformmal, majd etanollal kicsapatjuk. Az EcoRI-gyel és a XhoI-gyel való emésztés után a termékeket egy 0,8 %-os alacsony olvadáspontú agaróz gélen (SEA PLAQUE GTG, alacsony olvadáspontú agaróz; FMC Corp., Rockland, ME) frakcionáljuk. Egy a humán MPL-P receptor cDNS-nek megfelelő 1,9 kb-ú amplifikált terméket és egy az MPL-K receptor cDNS-nek megfelelő 1,7 kb-ú terméket nyerünk



a kimetszett gél szeletekből a gél mátrix beta agaráz I-gyel (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) való emésztésével, melyet etanolos kicsapítás követ. A cDNS-eket a pBluescript SK+ vektorba (Staratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) szubklónozzuk a szekvenálással törénő értékelés megvalósításához.

## 2. példa

### Az egér MPL receptor cDNS izolálása

A C57BL/KsJ-db/db egerekből lépjét eltávolítjuk, majd azonnal folyékony nitrogénbe helyezzük. A lép szövetből teljes RNS-t állítunk elő guanidin izotiocianátot (Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979) használva, ezt egy CsCl-os centrifugálási lépés követi. A lép poli(A)+ RNS-t oligo d(T) cellulóz kromatográfiát (Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-1412, 1972) használva izoláljuk.

Az 1,7 µg/µl koncentrációjú poli d(T)-szelektált poli(A)+ egér lép RNS 7,5 µl mennyiségét Not I restrikciós helyet tartalmazó 20 pmol/µl koncentrációjú első szál primer ZC6091 (7. számú szekvencia) 3 µl mennyiségével keverjük. Az elegyet 65 C° hőmérsékletűre hevítjük 4 percig, majd jégen való hűtéssel lehűtjük. Az első szál cDNS szintézist úgy indítjuk meg, hogy a 250 mM Tris-HCl-t (pH=8,3), 375 mM KCl-t, 15 mM MgCl<sub>2</sub>-öt (5x SUPERScript puffer; GIBCO BRL) tartalmazó elegyből 8 µl-t, 100 mM ditiotreitólból 4 µl-t és a 10 mM dATP-t, dGTP-t, dTTP-t és 5-metil-dCTP-t (egyenként 10 mM mennyiséget; Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) tartalmazó dezoxiribonukleotid trifoszfát oldatból 3 µl-t adunk hozzá az RNS-primer elegyhez. A reakcióelegyet 45 C° hőmérsékleten inkubáljuk 4 percig, ezt 200 U/µ RNáz H<sup>-</sup> reverz transzkriptáz (GIBCO BRL) 10 µl mennyiségének hozzáadása követi. Az első szál szintézisének hatékonyságát egy párhuzamos reakció elvégzésével analizáljuk, melyben 10 µCi <sup>32</sup>P-alfadCTP-t adunk a reakcióelegy azonos mennyiségéhez a



reakció jelölése céljából, az analízis megvalósításához. A reakcióelegyet 45 C° hőmérsékleten inkubáljuk 1 órán keresztül, ezt 50 C° hőmérsékleten történő 15 perces inkubálás követi. A jelölt reakcióelegyben a be nem épült <sup>32</sup>P-alfadCTP-t eltávolítjuk egy 400 porusméretű gélszűrő oszlopot (CHROMA SPIN + TE-400; Clontech Laboratories Inc.) használó kromatográfiával. A nem jelölt első szálú reakcióelegyből a be nem épült nukleotidokat a cDNS kétszeri kicsapatásával távolítjuk el 8 µg glikogén hordozó, 2,5 M ammónium acetát és 2,5 térfogat etanol jelenlétében. A jelölés nélküli cDNS-t 50 µl vízben reszuszpendáljuk a második szál szintézisben való alkalmazáshoz. A jelölt első szál cDNS hosszúságát agaróz gélelektroforézissel határozzuk meg.

A második szál szintézist az első szál cDNS-en végezzük el olyan körülmények között, melyek elősegítik a második szál szintézis első szál primelését a DNS hajtú formációban. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten állítjuk össze és a következőket tartalmazza: 50 µl jelölés nélküli első szál cDNS-t, 16,5 µl vizet, 20 µl 100 mM Tris:HCl-t (pH=7,4), 500 mM KCl-t, 25 mM MgCl<sub>2</sub>-öt, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-et, 1 µl 100 mM ditiotreitolt, 2 µl olyan oldatot, mely egyenként 10 mM dezoxiribonukleotid trifoszfátot tartalmaz, 3 µl 5 mM beta-NAD-ot, 15 µl 3 U/µl *E. coli* DNS ligázt (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) és 5 µl 10 U/µl *E. coli* DNS polimeráz I-et (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) tartalmazó 5x polimeráz I puffert. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten inkubáljuk 5 percig, ezt 1,5 µl 2 U/µl RN-áz H (GIBCO BRL) hozzáadása követi. Egy párhuzamos reakciót, melyben 10µl azonos mennyiségű második szál szintézises elegyet jelölünk 10 µCi <sup>32</sup>P-alfadCTP-vel, használunk a második szál szintézis hatékonyságának nyomonkövetésére. A reakcióelegyet 15 C° hőmérsékleten inkubáljuk két órán keresztül, ezt 15 percig tartó szobahőmérsékleten való inkubálás követi. A jelölt reakcióelegyben a be nem épült <sup>32</sup>P-alfadCTP eltávolítását egy 400 porusméretű gélszűrő oszlopot (Clontech

Laboratories, Inc.) használó kromatográfia segítségével valósítjuk meg az agaróz géles elektroforézissel való analízis előtt. A jelölés nélküli reakciót két fenol/kloroform elegyével történő extrakcióval állítjuk le, a kloroformmal való extrakciót etanolos kicsapatás követi 2,5 M ammónium acetát jelenlétében.

A hajtű szerkezet egyszálú DNS-ét "mung" bab nukleázzal hasítjuk. A reakcióelegy 100 µl második szál cDNS-t, 20 µl 10x "mung" bab nukleáz puffert (Stratagen Cloning Systems, La Jolla, CA), 16 µl 100 mM ditiotreitolt, 51,5 µl vizet és 12,5 µl 1:10 hígítású "mung" bab nukleáz hígítási pufferben levő "mung" bab nukleázt (Promega Corp., végső koncentrációja 10,5 U/µl) tartalmaz. A reakcióelegyet 15 percig 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk. A reakciót úgy állítjuk le, hogy hozzáadunk 20 µl 1 M Tris:HCl-t (pH=8,0), majd ezt követően fenol/kloroform elegyével és kloroformmal extraháljuk a fent leírtak szerint. Az extrahálás után a DNS-t etanolban precipitáljuk és vízben reszuszpendáljuk.

A reszuszpendált cDNS-t T4 DNS polimerázzal tompa-végűvé tesszük. A 190 µl vízben reszuszpendált cDNS-t 50 µl 5x T4 DNS polimeráz pufferrel (250 mM Tris:HCl, pH=8,0, 250 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>), 3 µl 0,1 M ditiotreitollal, 3 µl az egyes dezoxiribonukleotidokból 10 mM mennyiséget tartalmazó oldattal és 4 µl 1 U/µl T4 DNS polimerázzal (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) elegyítjük. 1 óráig tartó 10 C° hőmérsékleten való inkubálás után a reakciót 10 µl 0,5 M EDTA hozzáadásával állítjuk le, ezt sorozatos fenol/kloroform elegyével és kloroformmal történő extrahálás követ a fent leírtak szerint. A DNS-t egy 400 pórusméretű gél szűrési oszlopot (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA) használva kromatográfiának vetünk alá a protein nyomnyi mennyiségeinek eltávolítása céljából, valamint a 400 bázispárnál kisebb rövid cDNS-ek eltávolítása céljából. A DNS-t etanollal kicsapatjuk 12 µg glikogénes hordozó és 2,5 M ammónium acetát jelenlétében és 10 µl vízben reszuszpendáljuk. A <sup>32</sup>P-alfadCTP beépülésére

alapozva a cDNS hozamát körülbelül 2 µg mennyiségnek becsüljük a 12,5 µg kiindulási mRNS templátból.

Eco RI adaptereket ligálunk a cDNS 5' végeihez, hogy lehetővé tegyük lambda fág vektorba való klónozását. a cDNS 10 µl azonos mennyiségét (körülbelül 2µg) és 65 pmol/µl koncentrációjú Eco RI adapter (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) 10 µl mennyiségét keverjük 2,5 µl 10x ligáz pufferrel (Promega Corp.), 1 µl 10 mM ATP-vel és 2 µl 15 U/µl T4 DNS ligázzal (Promega Corp.). A reakcióelegyet egy éjszakán át inkubáljuk (-18 óra) 0 - 18 C° hőmérséklet grádiens alatt. A reakcióelegyet további egy éjszakán át 12 C° hőmérsékleten inkubáljuk. A reakciót úgy állítjuk le, hogy hozzáadunk 75 µl vizet és 10 µl 3 M Na acetátot, majd 65 C° hőmérsékleten 30 percig inkubáljuk. Inkubálás után a cDNS-t fenol/kloroform elegyével és kloroformmal extraháljuk a fent leírtak szerint, majd 2,5 M ammónium acetát és 1,2 térfogat izopropanol jelenlétében kicsapatjuk. Centrifugálás után a cDNS pelletet 70%-os etanollal mossuk, levegőn megszáritjuk és 89 µl vízben reszuszpendáljuk.

A cDNS egy lambda fág vektorba történő irányított klónozásának elősegítése céljából a cDNS-t NotI-gyel emésztjük, ez egy olyan cDNS-t eredményez, mely 5' EcoRI és 3' NotI kohéziós végekkel rendelkezik. A cDNS 3' végén levő NotI restrikciós helyet korábban a ZG6091 (7. számú szekvencia) primeren keresztül juttattuk be. A restrikciós enzimes emésztést egy olyan reakcióelegyben hajtjuk végre, mely a fent leírt cDNS-ből 89 µl-t, 6 mM Tris:HCl-ből 10 µl-t, 6 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 150 mM NaCl-ot, 1 mM DTT-t (10x D puffer; Promega Corp., Madison, WI) és a 12 U/µ NotI-ből (Promega Corp.) 1 µl-t tartalmaz. Az emésztést 37 C° hőmérsékleten hajtjuk végre 1 óra alatt. A reakciót sorozatos fenol/kloroform elegyével és kloroformmal való extrahálással állítjuk le. A cDNS-t etanollal kicsapatjuk, 70 %-os etanollal mossuk, levegőn megszáritjuk és 20 µl 1x gél terheléses pufferben (10 mM

Tris:HCl, pH=8,0; 1 mM EDTA, 5 % glicerol és 0,125 % brómfenol kék) reszuszpendáljuk.

A reszuszpendált cDNS-t 65 C° hőmérsékleten hevítjük 5 percig, lehűtjük jégen és 0,8 % alacsony olvadáspontú agaróz gélen (SEA PLAQUE GTG alacsony olvadáspontú agaróz; FMC Corp.) elektroforézisnek vetjük alá. A be nem épült adaptereket és az 1,6 kb hosszúságnál rövidebb cDNS-eket kimetsszük a gélből. Az elektródokat megfordítjuk és a cDNS-t addig elektroforáljuk, amíg az alapvonalhoz közeli értékre koncentrálódik. A koncentrált cDNS-t tartalmazó gél területet kimetsszük és mikrofuga csöbe helyezzük és a gél szelet körülbelüli térfogatát meghatározzuk. Körülbelül 300 µl víz azonos mennyiségét - mely megközelítően a gél szelet térfogatának háromszorosa - adjuk a csőhöz és az agarózt megolvasztjuk 65 C° hőmérsékletre való 15 percig tartó melegítéssel. A minta 42 C° hőmérsékletre való ekvilibrálása után 10 µl 1 U/µl beta-agaráz I-et (New England Biolabs, Inc.) adunk hozzá, majd a reakcióelegyet 90 percig inkubáljuk az agaróz emésztése céljából. Inkubálás után 40 µl 3 M Na acetátot adunk a mintához és a reakcióelegyet jégen inkubáljuk 15 percig. A mintát 14000 x g értéken centrifugáljuk 15 percig szobahőmérsékleten az emésztés nélküli agaróz eltávolítása céljából. A felülúszóban levő cDNS-t etanollal kicsapatjuk, 70 %-os etanollal mossuk, levegőn megszárítjuk és 37 µl vízben reszuszpendáljuk a kináz reakcióhoz a ligált EcoRI adapterek foszforilálása céljából.

A fent leírt cDNS oldat 37 µl mennyiségét hozzáadjuk 10 µl 10x ligáz pufferhez (Stratagen Cloning Systems), és a reakcióelegyet 65 C° hőmérsékletre melegítjük 5 percig. A reakcióelegyet jégen lehűtjük és hozzáadunk 5 µl 10 mM ATP-t és 3 µl 10 U/µl T4 polinukleotid kinázt (Stratagene Cloning Systems). A reakcióelegyet 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk 45 percig, majd 10 percig tartó 65 C° hőmérsékletre való hevítéssel a reakciót leállítjuk, ezután sorozatban fenol/kloroform

elegyével és kloroformmal extraháljuk. A foszforilált cDNS-t etanollal kicsapatjuk 2,5 M ammonium acetát jelenlétében, 70%-os etanollal mossuk, levegőn megszárítjuk, majd 12,5 µl vízben reszuszpendáljuk. A foszforilált cDNS koncentrációját körülbelül 40 fmol/µl értékűnek becsüljük.

A kapott cDNS-t az EcoRI-gyel és NotI-gyel előemésztetten vásárolt lambdaExCell lambda fág vektorba (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) klónozzuk és defoszforiláljuk. A cDNS vektorhoz való ligálását egy olyan reakcióelegyben hajtjuk végre, ami 2 µl 20 fmol/µl koncentrációjú előállított lambdaExCell fág karokat, 4 µl vizet, 1 µl 10x ligáz puffert (Promega Corp.), 2 µl 40 fmol/µl koncentrációjú cDNS-t és 1 µl 15 U/µl T4 DNS ligázt (Promega Corp.) tartalmaz. A ligálást 4 C° hőmérsékleten 48 óra alatt hajtjuk végre. Körülbelül a ligálási reakcióelegy 50 %-a épül be a fágba GIGAPACK II Gold csomagoló kivonatot (Stratagene Cloning Systems) használva az árusítók útmutatásának megfelelően. A kapott cDNS könyvtár  $1,5 \times 10^7$  független rekombinánsnál többet tartalmaz, 1,5 %-nál kevesebb inzert nélküli fág háttér szinttel.

Egy  $^{32}\text{P}$ -jelölt humán MPL-K receptor cDNS próbát használunk az egér lép cDNS fág könyvtárból való egér MPL receptor cDNS izolálása céljából. A cDNS könyvtárat az *E. coli* SURE törzsére (Stratagene Cloning Systems) szélesztjük 40000-50000 PFU/150 mm átmérőjű lemez sűrűségben. A 33 lemezről származó fág plakkokat nylon membránokra (Hybond N; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) transzferáljuk és a gyártók útmutatásának megfelelően dolgozzuk fel. A felhasznált szűrőket 2 óráig 80 C° hőmérsékleten hevítjük vákum sütőben, ezt 70 C° hőmérsékleten történő pufferrel (0,25 x SSC, 0,25% SDS, 1 mM EDTA) való mosás követ, majd egy éjszakán át 65 C° hőmérsékleten hibridizációs oldatban (5x SSC, 5x Denhardt-féle oldat, 0,1% SDS, 1 mM EDTA és 100 µg/ml hődenaturált lazac sperma DNS) előhibridizáljuk egy hibridizációs sütőben (HB-2-es modell, Techne Inc.

Princeton, NJ). A prehibridizáció után a hibridizációs oldatot leöntjük és a kereskedelembe beszerezhető jelölő kit (MEGAPRIME kit; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) felhasználásával készült körülbelül  $2 \times 10^6$  cpm/ml  $^{32}\text{P}$ -jelölésű humán MPL-K cDNS-t tartalmazó friss hibridizációs oldattal helyettesítjük. A próbát 5 percig  $98\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten való tartással denaturáljuk a hibridizációs oldathoz való hozzáadás előtt. A hibridizáció egy éjszaka alatt  $65\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten megy végbe. A szűrőket  $55\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten mossuk mosó pufferben ( $0,25 \times \text{SSC}$ ,  $0,25\%$  SDS,  $1\text{ mM EDTA}$ ) és élesztő szkrineken autoradiografáljuk 4 napig  $70\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten XAR-5 filmen (Kodak Inc. Rochester, NY). Az autoradiogramokat használva templátként agar plakkokat kapunk az elsődleges jeleknek megfelelő lemez régiókból, ezeket SM-be ( $0,1\text{ M NaCl}$ ;  $50\text{ mM Tris:HCl}$ ,  $\text{pH}=7,5$ ;  $0,02\%$  zselatin) merítjük a fágok eluálása céljából a plakk tisztításhoz. Hét plakk-tisztított fágot izolálunk, melyek hordozzák a humán MPL-K receptor próbához hibridizálódó inzerteket. A lambda ExCell fágokon belüli fágmidokat kinyerjük az eladók útásításainak megfelelően használt in vivo rekombináns rendszer használatával. A cDNS inzertek azonosságát DNS szekvenálással erősítjük meg.

Az izolált klónok egy olyan proteint kódolnak, mely magas fokú szekvencia azonosságot mutat a humán MPL-P receptorral valamint egy korábban leírt egér MPL receptorral (Skoda et al., EMBO J., 12:2645-2653, 1993). A hét klón két olyan csoportba tartozik, melyek egymástól három olyan klónban térnek el, melyek az N-terminushoz közeli 60 aminosav maradék szakaszát kódoló szekvencia deléciót tartalmaznak. A deléció nélküli proteint kódoló cDNS-re egér I-es típusú MPL receptor cDNS-ként utalunk. A II-es típusú receptor cDNS-ből hiányzik a 17. számú szekvencia I-es típusú receptor 131-190 maradékát kódoló szekvencia. Továbbá, az I-es és a II-es típusú receptorok a leírt egér MPL receptor szekvenciától (Skoda et al., ibid.) abban térnek el, hogy jelen van egy a 222-es aminosav maradék után

inzerált Val-Arg-Thr-Ser-Pro-Ala-Gly-Glu szekvenciát (9 . számú szekvencia) kódoló szekvencia, valamint a 241-es pozícióban egy glicin maradék szerinnel helyettesül (a pozíciók az I-es típusú egér receptorral utalnak).

Az I-es és a II-es típusú egér MPL receptor cDNS-eket a pHZ-1 plazmid vektorba szubklónozzuk emlős sejtekben való expresszálas céljából. A pHZ-1 plazmid egy olyan expressziós vektor, ami egy protein emlős sejtekben való expresszálasára használható, vagy egy béka oocita transzlációs rendszerben in vitro átírt mRNS-ekből. A pHZ-1 expressziós egység egy egér metalotionein-1 promótert, a kódoló szekvenciák inzerációjához való egyedüli restrikciós helyeket tartalmazó többszörös klónozó részek által határolt T7 bakteriofág promótert, a humán növekedési terminátort és a T7 bakteriofág terminátort tartalmazza. Továbbá, a pHZ-1 tartalmaz egy *E. coli* replikációs origót, egy bakteriális beta laktamáz gént, egy emlős szelektálható marker expressziós egységet - mely tartalmazza az SV40 promótert és origót - egy neomycin rezisztencia gént és az SV40 transzkripció terminátort. A pHZ-1 plazmidba való irányított klónozás elősegítése céljából egy megfelelő primereket használó polimeráz lánc reakciót alkalmazunk egy EcoRI hely és egy XhoI hely sorrendben a transzlációs iniciációs kódontól upstream irányban valamint a transzlációs terminációs kódontól downstream irányban való létrehozása céljából. A polimeráz lánc reakciót egy 10  $\mu$  10x ULTMA DNS polimeráz puffert (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), 6  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 0,2  $\mu$  dezoxiribonukleotid trifoszfát oldatot - mely az egyes dATP-ből, dGTP-ből, dTTP-ből és sCTP-ből (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) 10 mM mennyiségeket tartalmaz - a 20 pmol/ $\mu$ l ZC6603 (8. számú szekvencia) primerből 2,5  $\mu$ l-t, 32,8  $\mu$ l vizet, 1  $\mu$ l korai log fázisú, az I-es és a II-es típusú egér MPL receptor plazmidot tartalmazó baktérium tenyészetet és a 6 U/ $\mu$ l DNS polimerázból (ULTMA polimeráz; Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) 1  $\mu$ l mennyiséget tartalmaz. Az AmpliWax-

ot (Roche Molecular Systems, Inc.) a reakcióelegyben az árusító utasításainak megfelelően alkalmazzuk. A polimeráz lánc reakciót 25 cikluson keresztül futtatjuk (1 perc 95 C° hőmérséklet, 1 perc 55 C° hőmérséklet és 3 perc 72 C° hőmérséklet), ezt 72 C° hőmérsékleten történő 10 perces inkubálás követi. Az amplifikált termékeket sorozatosan fenol/kloroform elegyével és kloroformmal extraháljuk, majd etanollal kicsapatjuk 6 µg glikogén hordozó és 2,5 M ammónium acetát jelenlétében. A pelletet 87 µl vízben reszuszpendáljuk, melyhez 10 µl 10x H puffert (Boehringer Mannheim Corp.), 2 µl 10 U/µl EcoRI-et (Boehringer Mannheim) és 1 µl 40 U/µl XhoI (Boehringer Mannheim Corp.) adunk. Az emésztést 37 C° hőmérsékleten 1 óra alatt hajtjuk végre. A reakciót úgy állítjuk le, hogy a hőmérsékletet 15 percre 65 C°-ra emeljük, majd 400 porusméretű gélszűrési oszlopot (CHROMA SPIN + TE-400; Clontech Laboratories Inc.) használva kromatografáljuk.

A fent leírt izolált receptor inzerteket EcoRI-gyel és XhoI-gyel emésztett és defoszforilált pHZ-1 vektorba ligáljuk. A ligálási reakcióelegy 1 µl 50 ng/µl előállított pHZ-1 vektort, 5 µl 5 ng/µl cDNS inzertet, 2 µl 10x ligáz puffert (Promega Corp.), 11,75 µl vizet és 0,25 µl 4 U/µl T4 DNS ligázt (Stratagene Cloning Systems) tartalmaz. A ligálást egy éjszaka alatt valósítjuk meg 10 C° hőmérsékleten. A ligált DNS-eket *E. coli* sejtekbe (MAX EFFICIENCY DH10B kompetens sejtek GIBCO BRL) transzfektáljuk az árusítók utasításának megfelelően. Az I-es és a II-es típusú egér MPL és humán MPL-P receptor inzertek pHZ-1-beni érvényességét DNS szekvenálással erősítjük meg. A kapott pSLmpl-8 és pSLmp1-9 plazmidok sorrendben hordozzák az I-es és a II-es típusú MPL receptor cDNS-eket. A pSLmp1-44 plazmid a humán MPL-P cDNS inzertet hordozza.



### 3. példa

#### Az MPL receptorokat expresszáló BaF3 sejtvonalak megszerkesztése

Egy patkány csontvelőből származó (Palacios and Steinmetz, Cell 41:727-734; Mathey-Pevot et al., Mol. Cell. Biol. 6:4133-4135, 1986) interleukin-3 függő pre-limfoid sejtvonalat, a BaF3-at 10 % hővel inaktivált magzati borjú szérummal, tenyésztett WEHI-3 sejtekből (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) származó 4 % kondicionált tápközeggel, 2 mM L-glutaminnal, 2-merkaptotetanollal (1:280000 végső koncentráció) és PSN antibiotikumokkal (GIBCO BRL) kiegészített komplett tápközegben (RPMI 1640 tápközeg (JHR Bioscience Inc., Lenexa, KS) tartunk fenn. A cézium kloriddal tisztított pSLmp1-8, pSLmp1-9 és pSLmp1-44 plazmidokat az NdeI helynél linearizálunk a BaF3 sejtekbe történő elektroporáció előtt. Az elektroporációhoz a BaF3 sejteket egyszer RPMI 1640 tápközegben mossuk, majd  $10^7$  sejt/ml sejt sűrűségénél RPMI 1640 tápközegben reszuszpendáljuk. A reszuszpendált BaF3 sejtek 1 ml mennyiségét az egyes lineárizált plazmid DNS-ek 30 µg mennyiségével keverjük és elkülönített, eldobható elektroporációs kamrákba (GIBCO BRL) helyezzük. Egy 15 perces szobahőmérsékleten való inkubálás után a sejtek két sorozat sokkot kapnak (800 µFad/300 V.; 1180 µFad/300 V), melyet egy elektroporációs készülékkel (CELL PORATOR; GIBCO BRL) valósítunk meg. Öt perces pihenési idő után az elektroporált sejteket 10 ml komplett tápközegbe visszük át és 15-24 óráig 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk 5 % CO<sub>2</sub> mellett. Ezután a sejteket centrifugáljuk és reszuszpendáljuk 10 ml 1600 µg/ml G418-at tartalmazó komplett tápközegben és korlátozott higítás mellett 96 üregű szövettenyésztő lemezekre szélesztjük a G418 klónok izolálása céljából. Az MPL receptorok G418-rezisztens BaF3 klónokban való expresszálására a BaF3 mRNS Northern lenyomat analízisével következtetünk az MPL receptor transzkript jelenlétére. Egy BaF3/MPLR1.1 jelölésű sejtvonalat találtunk, mely az I-es típusú egér MPL receptor mRNS-t magas szinten

expresszálja és ezt használjuk a transzfektált BHK 570 sejtek kondicionált tápközegben való MPL ligandum aktivitásának ezt követő vizsgálatára. A II-es típusú receptor mRNS-t expresszáló BaF3 sejtvonalat BaF3/MPLR2-nek jelöljük.

#### 4. példa

##### Az oldható egér MPL receptor létrehozása

Az oldható egér I-es típusú MPL receptort (pLDmp1-53) kódoló emlős expressziós plazmidot úgy hozzuk létre, hogy a pSLmp1-9 plazmidból - a fent leírt teljes hosszúságú egér I-es típusú MPL receptort kódoló cDNS-t tartalmazó emlős expressziós plazmid - származó DNS szegmenteket egy a pSLmp1-26 plazmidból - egy az oldható egér I-es típusú MPL receptor baktériumokban való termeléséhez megszerkesztett expressziós plazmid - származó DNS szegmenttel kombináljuk.

Egy az egér I-es típusú MPL oldható receptort kódoló cDNS szegmentet izolálunk polimeráz lánc reakcióval (PCR-ral), melynek során a ZC6704 (10. számú szekvencia) és ZC6703 (11. számú szekvencia) primereket és templátként a teljes hosszúságú pSLmp1-9 receptor plazmidot használjuk. Az irányított klónozás elősegítése céljából a ZC6704 és ZC6703 primerek magukba foglalják megfelelő 5' végeiken az EcoRI és XhoI restrikciós helyeket. A ZC6703 primer egy a protein kinázhoz való kereten belüli konszenzus cél szekvenciát is magába foglal, ami lehetővé teszi az tisztított oldható receptor in vitro  $^{32}\text{P}$  gamma ATP-vel való jelölését (Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:558-562,1989). A PCR-t olyan reakcióelegyben hajtjuk végre, mely 10  $\mu\text{l}$  10x ULTMA DNS polimeráz puffert (Roche Molecular Systems, Inc), 6  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot, 0,2  $\mu\text{l}$  a dATP-ből, a dGTP-ből a dTTP-ből és a dCTP-ből (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) egyenként 10 mM mennyiséget tartalmazó dezoxiribonukleotid trifoszfát oldatot, 11  $\mu\text{l}$  4,55 pmol/ $\mu\text{l}$  ZC6704 primert (10 . számú szekvencia), 21  $\mu\text{l}$  2,43 pmol/ $\mu\text{l}$  ZC6703 primert (11 .

számú szekvencia), 50,3 µl vizet, 1 µl 50 ng/µl HindIII és XbaI emésztett pSLmp1-9 plazmidot és 1 µl 6 U/µl ULTMA DNS polimerázt (Roche Molecular Systems, Inc) tartalmaz. A reakcióelegyben AmpliWax-ot (Roche Molecular Systems, Inc) alkalmazunk az árusítók utmutatásának megfelelően. A polimeráz lánc reakciót 3 ciklusban futtatjuk (1 percen keresztül 95 C° hőmérsékleten, 1 percen keresztül 50 C° hőmérsékleten és 2 percen keresztül 72 C° hőmérsékleten), ezt 11 fokozott hibridizációs szigorúságú ciklus követi (1 percen keresztül 95 C° hőmérsékleten, 30 másodpercen keresztül 55 C° hőmérsékleten és 2 percen keresztül 72 C° hőmérsékleten), ezt 10 percen keresztül tartó 72 C° hőmérsékleten való inkubálás követi. Az amplifikált terméket sorozatos extrahálásnak vetjük alá fenol/kloroform elegyével és kloroformmal, amit 400 porusméretű géliszűrőses oszlopon (Clontech Laboratories Inc.) keresztüli kromatográfia követ. A PCR terméket etanollal kicsapatjuk 20 µg glikogén hordozó és 2,5 M ammónium acetát jelenlétében. A pelletet 32 µl vízben reszuszpendáljuk. A reszuszpendált PCR termék 16 µl mennyiségét 2 µl 10x H pufferhez (Boehringer Mannheim Corp.), 1 µl 10 U/µl EcoRI-hez (Boehringer Mannheim Corp.) és 1 µl 40 U/µl XhoI-hez (Boehringer Mannheim Corp.) adjuk. Az emésztést 37 C° hőmérsékleten hajtjuk végre 1 órán keresztül. Az emésztést úgy állítjuk le, hogy a hőmérsékletet 15 percen keresztül 65 C° hőmérsékletre emeljük és egy 0,7% alacsony olvadáspontú agaróz gélen tisztítjuk. Az alacsony olvadáspontú agaróz gélből való fragment kinyerést a gél mátrix beta-agaráz I-gyel (New England Biolabs) való emésztéssel valósítjuk meg.

A kapott PCR termék kódolja az egér I-es típusú MPL receptor N-terminális extracelluláris doménjét (27-480 maradék, 17. számú szekvencia). A feltételezett receptor transz-membrán domén (483-504 maradékok, 17. számú szekvencia) hiányában az expresszált proteintól azt várjuk, hogy egy megfelelő jel peptid jelenlétében szekretálódik. Egy az egér II-es típusú oldható MPL receptort kódoló

cDNS-t a fent leírt PCR körülmények alkalmazásával nyerjük azzal az eltéréssel, hogy templátként a pSLmp1-8 plazmidot használjuk. A két receptor fragment érvényességét DNS szekvenálással erősítjük meg.

Az oldható egér I-es és II-es típusú MPL receptort kódoló DNS fragmenteket az EcoRI és XhoI emésztett pOmpA2-5 vektorba klónozzuk, hogy sorrendben a pSLmp1-26 és a pSLmp1-27 plazmidokat hozzuk létre. A pOmpA2-5 plazmid a pOmpA2 plazmid (Ghrayab et al., EMBO J. 3: 2437-2442, 1984) módosítása, egy olyan bakteriális expressziós vektor, melyet azért terveztek meg, hogy a rekombináns proteint a periplazmás térbe irányítsa. A pOmpA2-5 plazmidot úgy szerkesztettük meg, hogy a pOmpA2 plazmid EcoRI és BamHI helyek közötti 13 bázispár hosszúságú szekvenciáját egy 42 bázispár hosszúságú szintetikus szekvenciával helyettesítjük. A szekvenciát úgy hoztuk létre, hogy két 42 nukleotidból álló komplementer oligonukleotidot (ZC6707, 12. számú szekvencia; ZC6706, 13. számú szekvencia) anneáltunk, melyek a bázispárosodáskor EcoRI és BamHI kohéziós végeket hoznak létre, elősegítve az EcoRI-gyel és BamHI-gyel emésztett pOmpA2 plazmidba való irányított klónozást. Az inzertált szekvencián belül található egy XhoI hely kereten belül a bakteriális vezető szekvenciához, valamint a fent leírt egér MPL oldható receptort kódoló cDNS-ekhez képest, valamint tartalmaz egy kereten belüli 6 hisztidin kódonból álló szakaszt, mely a XhoI helytől 3' irányban található, abból a célból, hogy lehetővé tegye a rekombináns protein fém kelációs affinitás kromatográfiával való tisztítását (Houchuli et al., Bio/Technology 6:1321-1325, 1988). A hisztidin szakaszt kódoló szekvencia után egy kereten belüli terminációs kódon található. A pOmpA2-5, pSLmp1-26 és a pSLmp1-27 plazmidok érvényességét DNS szekvenálással erősítjük meg.

Egy az oldható egér I-es típusú MPL receptort termelő emlős expressziós plazmid, a pLDmp1-53 plazmid kerül megszerkesztésre oly módon, hogy a pSLmp1-

9 és a pSLmp1-26 plazmidokból származó DNS szegmenteket a pHZ-200 expressziós vektorba (olyan pHZ-1 vektor, melyben egy dihidrofolát reduktáz szekvencia helyett a neomycin rezisztencia gén található) juttatjuk be. A pSLmp1-9 plazmidból származó 1164 bázispár hosszúságú EcoRI/BamHI cDNS fragment helyettesíti az emlős jel szekvenciát, melyet a pSLmp1-26 bakteriális expressziós plazmid megszerkesztése során vetettünk alá deléciónak. A pSLmp1-26 plazmidból származó 416 bázispár hosszúságú BamHI fragment biztosítja az oldható MPL receptor karboxi terminális részének kódoló szekvenciáját, a kináz jelölő domént, a poli-hisztidin szakaszt és a transzlációs terminátort. A két fragmentet gél tisztítjuk és a pBluescript KS+ plazmid (Stratagene Cloning Systems) EcoRI/BamHI helyeire klónozzuk a pBS8.76LD-5 plazmid létrehozása céljából. A 416 bázispár hosszúságú pSLmp1-26 eredetű BamHI fragment 1164 bázispár hosszúságú pSLmp1-9 eredetű EcoRI/BamHI fragmenthez viszonyított pBS8.76LD-5 plazmidban való helyes orientációját PCR-rel határozzuk meg a ZC6603 (8. számú szekvencia) és a ZC6703 (11. számú szekvencia) primerek felhasználásával. A pBS8,76LD-5 plazmid poli-kötő szekvenciáján belül levő XbaI hely lehetővé teszi, hogy az újra megszerkesztett receptor cDNS-t egy 1,5 kb hosszúságú EcoRI/XbaI fragmentként metsszük ki a pHZ-200 plazmidba való klónozáshoz, a vektor EcoRI-gyel és XbaI-gyel való emésztését követően. A kapott emlős expressziós plazmidot, a pLDmp1-53 plazmidot, nagy léptékben termeljük a BHK sejtekbe való transzfekcióhoz.

A tisztított pLDmp1-53 plazmid 20 µg mennyiségét transzfektáljuk BHK 570 sejtekbe a kalcium foszfát kicsapatásos módszert használva. Öt óra után a sejteket 15 % glicerollal sokkoljuk 3 percen keresztül a DNS felvétel elősegítése céljából. Friss szaporodási tápközeget adunk egy éjszakán keresztül. A következő napon a sejteket különböző hígításokra osztjuk és 1 µM metotrexátot tartalmazó szelekciós tápközeget adunk hozzá. Megközelítően két hét után diszkrét metotrexát-rezisztens

telepek láthatók. A rezisztens telepeket vagy összegyűjtjük, vagy megkülönböztetett klónokként tartjuk fenn. Az összegyűjtött telepek kimerült tápközegét azonnal teszteljük az oldható MPL receptor protein jelenlétére.

Az oldható MPL receptor proteint a protein karboxi-terminusán jelen levő polihisztidin szakasz és az immobilizált  $\text{Ni}^{2+}$ -t (HIS-BIND; Novagen, Madison, WI) tartalmazó fém kelátképző gyantával való vegyítéssel izoláljuk. Az összegyűjtött pLDmp1-53 plazmidról származó szérum mentes fáradt tenyésztési tápközegét átengedjük a gyantán és a kötött proteint 1 M imidazollal eluáljuk. Az SDS-PAGE analízis egy egyedüli -67 kDa sávot fed fel. Ezt a proteint N-terminális aminosav analízisnek vetjük alá és megerősítjük, hogy egér MPL receptor.

Az oldható egér MPL receptort BHK transzfektánsok összegyűjtött mennyiségéből tisztítjuk, melyeket a pLDmp1-53 plazmidot expresszáló oldható egér I-es típusú MPL receptorral transzfektáltunk. A tisztított oldható receptort CNBr-aktivált SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) mátrixon immobilizáljuk alapjában véve a gyártók utasításának megfelelően és a 24-11-5 sejtek kondicionált tápközegben való MPL aktivitásának affinitási tisztítására használjuk. Az affinitási mátrix egy XK16 oszlopba van csomagolva (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.). A 24-11-5 sejtekről származó kondicionált tápközegét egy 10 Kd hasítású üreges rost membránon (A/G Technology Corp., Needham, MA) koncentrálnak és az MPL receptor affinitási oszlop aljára helyezük 1 ml/perc átfolyási sebességgel. Az oszlopot 0,5 M NaCl-ot és 0,01% nátrium azidot tartalmazó foszfát pufferelt sóoldattal (PBS) mossuk. Az MPL aktivitást az oszlopról 3M kálium tiocianáttal (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) eluáljuk 0,5 ml/perc átfolyási sebességgel. A kálium tiocianátot PBS-sel szembeni dialízissel távolítjuk el. Az aktív frakciókat MTT proliferációs vizsgálattal azonosítjuk (a 7. példában kerül leírásra).

## 5. példa

### Egy MPL receptor ligandumot expresszáló sejtvonal izolálása és jellemzése

A BaF3/MPLR1.1 sejtek IL-3 függő sejtek, melyek egy stabilan transzfektált I-es típusú egér MPL receptort expresszálnak. Egy mutagenézises és szelekciós sémát találtunk ki az MPL receptor ligandumot expresszáló sejtvonalak izolálására, a BaF3/MPLR1.1 sejtek mutagenizálásával, valamint az exogén IL-3 hiányában való autokrin szaporodásra való szelektálással.

Megközelítően  $1,2 \times 10^6$  BaF3/MPLR1.1 sejtet pelletizálunk és GM-mel (2-merkaptóetanollal (1:240000 végső koncentráció), 2 mM L-glutaminnal, 110 µg/ml nátrium piruváttal, 50 µg/ml G418-cal és 10 % hőinaktivált magzati borjú szérummal kiegészített RPMI 1640 tápközeg) mossuk. A sejteket 2 ml 0,15 % (v/v) mutagén 2-etil-metán-szulfonátot (EMS) tartalmazó GM-ben reszuszpendáljuk és 2 órán keresztül 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk. Inkubálás után a sejteket egyszer PBS-sel mossuk, egyszer pedig GM-mel, majd 10 cm-es lemezekre szélesztjük megközelítően 40000 sejt/ml sűrűségben 5 % WEHI-3-mal kiegészített GM kondicionált tápközegben (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) IL-3 forrásként. A sejtek egy hét napig tartó felépülési időt kapnak 37 C° hőmérsékleten való inkubálás mellett 5 % CO<sub>2</sub> alatt az IL-3 független szaporodásra való szelekció előtt. A felépülési időtartam után a tenyészetet az élő sejtektől sűrű. A sejteket GM-mel mossuk és GM-ben tenyésztjük WEHI-3 kondicionált tápközeg hiányában. A 11 napos szelekció után kis számú élő sejt figyelhető meg. Az IL-3 független tenyészet élő sejt denzitását 250 sejt/ml értékűnek becsüljük. Az IL-3 független tenyészet 1 ml mennyiségét egy 24 üregű tenyész lemez 19 üregébe szélesztjük a további jellemzés céljából.

A fenti IL-3 szaporodás-független BaF3/MPLR1.1 sejtekről származó kondicionált tápközegre proliferatív aktivitásra vizsgáljuk BaF3/MPLR sejteket. A 19



IL-3 szaporodás független összegyűjtött kondicionált tápközegek az MTT proliferatív vizsgálatban aktívnak találtuk (7. példában került leírásra). A pozitív tápközeget újra vizsgáljuk a 2 µg/ml patkány anti-egér IL-3, anti-egér IL-3, anti-egér IL-4 jelenlétében mutatózó proliferatív aktivitásra, vagy mindkét neutralizáló antitest (Pharmigen, San Diego, CA) jelenlétében mutatózó aktivitásra az ezen citokineket expresszáló IL-3 szaporodás-független mutánsok azonosítása céljából. (Egy korábbi vizsgálatban azt találtuk, hogy a BaF3 sejtek az IL-4-re is reagálnak.) Csak a #11 ("24-11" sejteknek jelöljük) számú lemez sejtjeiről származó kondicionált tápközeg rendelkezik olyan aktivitással, amit az IL-3 vagy az IL-4 antitestek nem semlegesítenek.

A fent leírt mutagenézises és szelekciós sémát öt más BaF3/MPLR1 klónnal (BaF3/MPLR1 #4, 9, 12, 15 és 18 sorrendben BaF3/MPLR1.4, 9, 12, 15 és 18 jelölések) is elvégeztük. Tizenhét izolátumot találtunk olyan kondicionált tápközeggel, mely a Baf#/MPLR1 sejtek szaporodását stimulálja. Azt az eredményt kaptuk, hogy az anti-IL-3 vagy IL-4 antitestek egyedül vagy kombinációban semlegesítik ezen tápközegek aktivitását. Ezeket a klónokat a továbbiakban nem jellemezzük.

A 24-22 sejtekről gyűjtött kondicionált tápközeg proliferatív aktivitását részletesen jelemezzük. A 24-11 csoportot 19 alcsoportra osztjuk és a kondicionált tápközeget újra teszteljük az aktivitásra. Mind a 19 csoport (azaz a 24-11-1 - 24-11-19) stimulálja az IL-3 szaporodás függő BaF3/MPLR1 sejtek szaporodását az exogén IL-3 hiányában. Az aktivitást nem gátolják az IL-3 vagy az IL-4 semlegesítő antitestek vagy ezen antitestek kombinációi.

Két kísérletet hajtunk végre a 24-11 aktivitás specifitásának meghatározása céljából. A kondicionált tápközeget a proliferatív aktivitásra vizsgáljuk olyan kontroll BaF3 sejteken, melyek nem expresszálják az MPL receptort. Az exogén IL-3 hiányában a kontroll BaF3 sejtek szaporodása nem figyelhető meg a kondicionált



tápközegben a 19 24-11 alcsoport egyike esetében sem. Egy második vizsgálatban a proliferatív aktivitást a tisztított oldható MPL receptor általi gátlásra vizsgáljuk. A BaF3/MPLR1 sejteket 50 % 24-11 kondicionált tápközeggel kiegészített GM tápközegben tenyésztjük. Az egyes mintákhoz hozzáadunk I-es típusú egér oldható MPL receptort, úgy hogy a végső koncentrációk 0,0, 0,625, 1,25, 2,5 vagy 5,0  $\mu\text{g/ml}$  értékek legyenek. Az eredményeket négy nappal később értékeljük MTT sejt proliferatív vizsgálattal. A 24-11 kondicionált tápközeg proliferatív aktivitását az oldható MPL receptor 0,625 - 1,25  $\mu\text{g/ml}$  koncentráció esetében teljesen gátolja. Az aktivitást teljes mértékben gátló oldható receptor koncentrációk nincsenek hatással a BaF3/MPLR1 sejtek IL-3 vagy IL-4 általi stimulálására. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az oldható MPL receptor a 24-11 tápközeg stimulatív aktivitásával versenyez és ez egybe esik azzal a hipotézissel, miszerint a 24-11 sejtek MPL receptor ligandumot expresszálnak.

A 24-11 sejtekből származó klónokat hígítási sorok szélesztésével izoláljuk. Egy klón, melyet 24-11-5 #3-nak jelölünk, magas szintű proliferatív aktivitást mutat kondicionált tápközegében a 24-11 csoporthoz viszonyítva. A proliferatív aktivitást a WEHI-3 sejtekről származó kondicionált tápközeg (Becton Dickinson labware) 1:2000 hígításával találtuk azonosnak.

## 6. példa

### A 24-11-5 #3 cDNS könyvtár megszerkesztése

Körülbelül  $2,7 \times 10^8$  24-11-5#3 sejtől állítunk elő teljes RNS-t guanidin izotiocianátot használva, amit CsCl-os centrifugálás követ (Chirgwin et al., ibid.). Poli(A)<sup>+</sup> RNS-t izolálunk OLIGOTEX-dT-mRNS izolálási kitet (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) használva a gyártók útmutatásának megfelelően.

A 24-11-5#3 sejtekből származó első szál cDNS-t négy különböző párhuzamos reakcióban szintetizáljuk. Az egyes reakcióelegyek a következőket tartalmazzák: 7  $\mu$ l poli d(T)-szelektált poli(A)<sup>+</sup> 24-11-5#3 RNS-t 1,6  $\mu$ g/ $\mu$ l koncentrációban és 2,5  $\mu$ l 20 pmol/ $\mu$ l koncentrációjú Xho restrikciós helyet tartalmazó ZC6172 (14. számú szekvencia) első szál primert. A reakcióelegyet 4 percen keresztül 65 C° hőmérsékletre hevítünk, majd jégen lehűtjük. Az első szál cDNS szintézist úgy indítjuk el, hogy hozzáadunk az RNS-primer elegyhez 8  $\mu$ l első szál puffert (5 x SUPERSCRIPT puffer; GIBCO BRL), 4  $\mu$ l 100 mM ditiotreitolt és 2  $\mu$ l . A reakcióelegyet 4 percen keresztül 45 C° hőmérsékleten inkubáljuk, ezután hozzáadunk 10  $\mu$ l 200 U/ $\mu$ l RN-áz H<sup>-</sup> reverz transzkriptázt (GIBCO BRL). Az első szál szintézis hatékonyságát egy párhuzamos reakcióban analizáljuk, úgy, hogy hozzáadunk 10  $\mu$ Ci <sup>32</sup>P-alfadCTP-t az egyik reakcióelegyből egy 10  $\mu$ l azonos mennyiséget a reakció jelölése céljából az analízis elvégzéséhez. A reakcióelegyet 1 órán keresztül 45 C° hőmérsékleten inkubáljuk, majd 15 percen keresztül 50 C° hőmérsékleten. A jelölt reakcióelegyben levő be nem épült <sup>32</sup>P-alfadCTP-t kromatográfiával eltávolítjuk egy 400-as pórusméretű gélszűréses oszlopot (Clontech Laboratories) használva. A nem jelölt első szál reakciókat összegyűjtjük, a be nem épült nukleotidokat úgy távolítjuk el, hogy a cDNS-t kétszer kicsapatjuk 32  $\mu$ g glikogén hordozó, 2,5 M ammónium acetát és 2,5 térfogat etanol jelenlétében. A jelölés nélküli cDNS-t 144  $\mu$ l vízben reszuszpendáljuk a második szál szintézisben való felhasználáshoz. A jelölt első szál cDNS hosszúságát agaróz gél elektroforézissel határozzuk meg.

A második szál szintézist az első szál cDNS-en hajtjuk végre olyan körülmények között, mely elősegíti a második szál szintézis első szál primelését, DNS hajtú képződést eredményezve. Három különböző párhuzamos második szál reakciót hajtunk végre. Az egyes második szál reakcióelegyek a következőket

tartalmazzák: a nem jelölt első szál cDNS 48 µl mennyiségét, 16,5 µl vizet, 20 µl 5x polimeráz I puffert (100 mM Tris:HCl-t, pH=7,4, 500 mM KCl-ot, 25 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-et, 1 µl 100 mM ditioneitol, 1 µl dezoxiribonukleotid trifoszfát oldatot, ami a dATP-ből, dGTP-ből dTTP-ből és az 5-metil-dCTP-ből (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) egyenként 10 mM mennyiséget tartalmaz, 3 µl 5 mM beta-NAD-ot, 1 µl 3 U/µl *E. coli* DNS ligázt ((New England Biolabs Inc.) és 5 µl 10 U/µl *E. coli* DNS polimeráz I-et (Amersham Corp.). A reakcióelegyet szobahőmérsékleten állítjuk össze majd 5 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk, ezután hozzáadunk 1,5 µl 2 U/µl RN-áz H-t (GIBCO BRL). A második szál szintézises reakcióelegy egyikéből 10 µl mennyiséget jelölünk úgy, hogy hozzáadunk 10 µCi <sup>32</sup>P-alfadCTP-t a második szál szintézis hatékonyságának nyomonkövetése céljából. A reakcióelegyet 2 órán keresztül 15 C° hőmérsékleten inkubáljuk, ezután 15 percen keresztül szobahőmérsékleten. A jelölt reakcióelegyben levő be nem épült <sup>32</sup>P-alfadCTP-t kromatográfiával távolítjuk el egy 400-as pórusméretű gélszűréses oszlopot (Clontech Laboratories) használva az agaróz gél elektroforézis elvégzése előtt. A nem jelölt reakcióelegyet összegyűjtjük és fenol/kloroform elegyével és kloroformmal extraháljuk, majd 2,5 M ammónium acetát jelenlétében etanollal kicsapatjuk.

A hajtú szerkezet egyszálú DNS-ét "mung" bab nukleázt használva hasítjuk. A reakcióelegyet a következőket tartalmazza: 20 µl 10x "mung" bab nukleáz puffert (Stratagene Cloning Systems), 16 µl 100 mM ditioneitol, 48 µl vizet, 10 µl "mung" bab nukleáz hígítási oldatot (Stratagene Cloning Systems) és 6 µl 50 U/µl "mung" bab nukleázt (Promega Corp.). A reakcióelegyet 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk 30 percen keresztül. A reakciót úgy állítjuk le, hogy hozzáadunk 20 µl 1M Tris:HCl-t, pH=8,0), majd ezt követően fenol/kloroform elegyével extraháljuk a fent leírtak

szerint. Az extrahálás után a DNS-t etanollal kicsapatjuk majd vízben reszuszpendáljuk.

A reszuszpendált cDNS-t T4 DNS polimerázzal tompa végűvé tesszük. A 188 µl vízben reszuszpendált cDNS-t 50 µl 5x T4 DNS polimeráz pufferrel (250 mM Tris:HCl, pH=8,0, 250 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>), 3 µl 0,1 M ditiotreitollal, 4 µl dezoxiribonukleotid trifoszfátokat tartalmazó oldattal és 5 µl 1 U/µl T4 DNS polimerázzal (Boehringer Mannheim Corp.) keverjük össze. 15 C° hőmérsékleten való 30 percen keresztüli inkubálás után a reakciót leállítjuk úgy, hogy 10 µl 0,5 M EDTA-t adunk hozzá, majd fenol/kloroform elegyével és kloroformmal extraháljuk a fent leírtak szerint. A DNS-t kromatografáljuk egy 400-as pórusméretű gélszűréses oszlopot (Clontech Laboratories) használva a protein nyomnyi mennyiségeinek eltávolítása céljából, valamint a körülbelül 400 bázispár hosszúságnál rövidebb rövid cDNS-ek eltávolítása céljából. A DNS-t etanollal kicsapatjuk 10 µg glikogén hordozó és 2,5 ammónium acetát jelenlétében, majd 15 µl vízben reszuszpendáljuk. A <sup>32</sup>P-alfadCTP beépülésre alapozva, a cDNS hozamot körülbelül 8 µg mennyiségnek becsüljük a 40 µg kiindulási mRNS-ből.

EcoRI adaptereket ligálunk a fent leírt cDNS 5' végeihez egy expressziós vektorba való klónozás lehetővé tétele céljából. 10 µl cDNS-t (körülbelül 5 µg) és 21 µl 65 pmol/µl koncentrációjú EcoRI adaptert keverünk össze (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) 4 µl 10x ligáz pufferrel (Promega Corp.), 3 µl 10 mM ATP-vel és 3 µl 15 U/µl T4 DNS ligázzal (promega Corp.). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül (körülbelül 48 óra) 9 C° hőmérsékleten inkubáljuk. A reakciót úgy állítjuk le, hogy hozzáadunk 140 µl vizet, 20 µl 10x H puffert (Boehringer Mannheim Corp.), majd 40 percen keresztül 65 C° hőmérsékleten inkubáljuk. Inkubálás után a cDNS-t fenol/kloroform elegyével és kloroformmal extraháljuk a fent leírtak szerint, majd 2,5 ammónium acetát és 1,2 térfogat izopropanol jelenlétében kicsapatjuk. Centrifugálás

után a cDNS pelletet 70 % etanollal mossuk, levegőn megszárítjuk és 89 µl vízben reszuszpendáljuk.

A cDNS egy expressziós vektorba való irányított klónozásának elősegítése céljából a cDNS-t XhoI-gyel emésztjük, ami egy olyan cDNS-t eredményez, mely egy 5' EcoRI kohéziós véget és egy 3' XhoI kohéziós véget eredményez. A cDNS 3' végén a XhoI restrikciós helyet korábban juttattuk be a ZC6172 primert (14. számú szekvencia) használva. A restrikciós enzimekkel való emésztést egy olyan reakcióelegyben hajtjuk végre, ami a következőket tartalmazza: 89 µl fent leírt cDNS-t, 10 µl 10x H puffert (Promega Corp.) és 1,5 µl 40 U/µl XhoI-et (Boehringer Mannheim Corp.). A emésztést 1 órán keresztül 37 C° hőmérsékleten hajtjuk végre. A reakciót sorozatos fenol/kloroform elegyével és kloroformmal extraháljuk és egy egy 400-as pórusméretű gélszűréses oszlopot (Clontech Laboratories) használva kromatografáljuk.

A cDNS-t etanollal kicsapatjuk, 70 %-os etanollal mossuk, levegőn megszárítjuk és 20 µl 1 x gél terhelő pufferben (10 mM Tris:HCl, pH=8,0, 1 mM EDTA, 5 % glicerol és 0,125 % brómfenol kék) reszuszpendáljuk. A reszuszpendált cDNS-t 5 percen keresztül 65 C° hőmérsékleten hevítjük, majd jégen lehűtjük és 0,8 % alacsony olvadáspontú agaróz gélen (SEA PLAQUE GTM alacsony olvadáspontú agaróz; FMC Corp.) elektroforézisnek vetjük alá. A szennyező adaptereket és a 0,5 kb hosszúság alatti cDNS-t kimetsszük a gélből. Az elektródokat megfordítjuk és a cDNS-t egészen addig elektroforézisnek vetjük alá, míg a pálya eredethez közeli értékűre nem koncentrálódik. A koncentrált cDNS-t tartalmazó gél területet kimetsszük és mikrocentrifuga csövekbe helyezzük, és a gél szelet körülbelüli térfogatát meghatározzuk. A gél szelet térfogatának mintegy háromszoros térfogatú víz mennyiségét adunk a csőhöz és az agarózt 15 percen keresztül 65 C° hőmérsékleten megolvasztjuk. A minta 45 C° hőmérsékletre való ekvilibrálása után 5

$\mu\text{l}$  1 U/ $\mu\text{l}$  beta agarázt (New England Biolabs, Inc.) adunk hozzá, majd a reakcióelegyet 90 percen keresztül  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten inkubáljuk az agaróz emésztése céljából. Inkubálás után  $40\ \mu\text{l}$  3 M Na acetátot adunk a mintához és a reakcióelegyet jégen inkubáljuk 15 percen keresztül. A mintát  $14000\ \times\ g$  értéken centrifugáljuk 15 percen keresztül szobahőmérsékleten a nem emésztett agaróz eltávolítása céljából, majd kromatografáljuk egy 400-as pórusméretű gélszűréses oszlopot (Clontech Laboratories) használva. A cDNS-t etanollal kicsapatjuk, 70 %-os etanollal mossuk, levegőn megszárítjuk és  $70\ \mu\text{l}$  vízben reszuszpendáljuk a kinázos reakcióhoz a ligált EcoRI adapterek foszforilálása céljából.

A  $70\ \mu\text{l}$  cDNS oldathoz hozzáadunk  $10\ \mu\text{l}$  10x ligáz puffert (Stratagene Cloning Systems) és a reakcióelegyet 5 percen keresztül  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten melegítjük. A reakcióelegyet jégen lehűtjük és hozzáadunk  $16\ \mu\text{l}$  10 mM ATP-t és  $4\ \mu\text{l}$  10 U/ $\mu\text{l}$  T4 polinukleotid kinázt (Stratagene Cloning Systems). A reakcióelegyet  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáljuk, majd a reakciót 10 percen keresztül  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten való hevítéssel termináljuk, amit fenol/kloroform elegyével és kloroformmal történő extrahálás követ. A foszforilált cDNS-t etanollal kicsapatjuk 2,5 M ammónium acetát jelenlétében, majd 70 etanollal mossuk, levegőn megszárítjuk és  $10\ \mu\text{l}$  vízben reszuszpendáljuk. A foszforilált cDNS koncentrációját körülbelül  $40\ \text{fmol}/\mu\text{l}$  értékűnek becsüljük.

A pDX emlős expressziós vektort (a 4,959,318 számú US szabadalomban került leírásra)(ábrák) úgy, hogy befogadja a 24-11-5#3 cDNS-t, melyet EcoRI-XhoI végekkel szintetizáltunk. A pDX vektoron levő endogén Sall helyet a plazmid Sall-gyel való emésztésével, valamint a Sall kohéziós végek T4 DNS polimerázzal való tompává tétele utáni recirkularizációjával kiiktatjuk. A recirkularizált plazmidot EcoRI-gyel emésztetjük, majd egy rövid polilinker szekvenciát ligálunk hozzá, mely két komplementer oligonukleotidot, a ZC6936-ot (15. számú szekvencia) és a ZC6937-et

(16. számú szekvencia) tartalmaz a pDX.ES. plazmid létrehozása céljából. A pDX.ES plazmidon levő bejuttatott polilinker szekvencia EcoRI és Sall helyeket tartalmaz az EcoRI-XhoI végekkel szintetizált 24-11-5 cDNS irányított klónozásának elősegítése céljából.

Egy plazmid cDNS könyvtárát állítunk elő az EcoRI-XhoI 24-11-5 cDNS EcoRI/Sall-gyel emésztett pDX.ES plazmidba való ligálásával. A ligációs reakcióelegyet *E. coli*-ba elektroporációval (ELECTROMAX DH10B kompetens sejtek; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) bejuttatjuk egy gén pulzáló/pulzus szabályozó és 0,2 cm-es kűvetta (Bio-Rad Laboratories, hercules, CA) segítségével 0,2 KV, 400 ohm és 25  $\mu$ FAD alkalmazása mellett. A sejteket 1,5 ml mennyiségűre hígítjuk Luria táplevesben, majd 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk 45 percen keresztül, ezután hozzáadunk 0,75 ml 50 %-os glicerolt. A transzfektált sejteket azonos mennyiségűvé tesszük, és felhasználásig -70 C° hőmérsékleten tároljuk. 80 fmol cDNS több mint 700000 független rekombináns plazmidot eredményez.

### 7. példa

#### A 24-11-5 cDNS könyvtár MPL aktivitásra való expressziós szkrínélése

A 24-11-5#3 cDNS könyvtárát megközelítően 2000 10 cm átmérőjű 100  $\mu$ g/ml ampicillinnel kiegészített Luria tápközeget tartalmazó lemezekre szélesztjük. A szélesztési sűrűség 200-250 bakteriális telep/lemez érték közötti. A BHK 570 sejtekbe való transzfektációhoz a plazmid DNS-t az egyes baktériumos lemezekről állítjuk elő MAGIC MINIPREPS DNS tisztítási gyantát használva (Promega Corp.) a gyártók útmutatásának megfelelően. A plazmid DNS-eket a BHK 570 sejtekbe való transzfektálás előtt -20 C° hőmérsékleten tároljuk.

A 24-11-5 #3 cDNS plazmid összegyűjtött mennyiségeit - melyek mindegyike megközelítően 200-250 cDNS klónt tartalmaz - BHK 570 sejtekbe transzfektáljuk

egy 2,3-dioleiloxi-N-[2(spermin-karboxi-amido)etil]-N,N-dimetil-1-propán-aminium-trifluor-acetát és vízben levő dioleil-foszfatidil-etanol-amin 3:1 liposzóma készítményét használva. 20 µl 30 ng/µl DNS-t adunk 20 µl 1:10 hígítású LIPOFECTAMINE oldathoz, majd szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáljuk. Az inkubálást követően 160 µl szérumentes tápközeget (Hams 2 mM L-glutaminnal, 0,11 mg/ml nátrium piruváttal, 5 µg/ml inzulinnal, 5 µg/ml fetuinnal, 10 µg/ml transferrinnel, 2 ng/ml szelén IV oxiddal és 25 mM HEPES pufferrel kiegészített F12: Dulbecco-féle MEM (1:1)) adunk hozzá a DNS/LIPOFECTAMINE elegyhez, majd 24 üregű mikrotiter lemezekre helyezzük, melyek megközelítően 100000 BHK 570 sejtet tartalmaznak. A sejteket 37 C° hőmérsékleten, 5% CO<sub>2</sub> alatt inkubáljuk 4 órán keresztül, majd hozzáadunk 200 µl BHK Szaporító Tápközeget (2 mM L-glutaminnal, 0,11 mg/ml nátrium piruváttal, 5 % hőinaktivált magzati borjú szárummal és 100x PSN antibiotikumokkal (GIBCO BRL) kiegészített Dulbecco-féle módosított Eagles-féle tápközeg). A sejteket 16 órán keresztül inkubáljuk. A tápközeget eltávolítjuk és 0,5 ml friss BHK Szaporító Tápközeggel helyettesítjük, melyet 48 órán keresztül kondicionáltunk az MPL aktivitásra való tesztelés előtt.

Egy sejt proliferációs vizsgálatot használunk a könyvtár transzfektált BHK 570 sejtek kondicionált tápközegben levő MPL aktivitás jelenlétének detektálása céljából. 100 µl kondicionált tápközeget adunk 2 mM L-glutaminnal, PSN antibiotikumokkal (GIBCO BRL), 0,00036 % 2-merkaptóetanollal és 10 % hőinaktivált magzati borjú szárummal kiegészített RPMI 1640 tápközegben (JRH Bioscience INc., Lenexa, KS)levő 100 µl 10<sup>6</sup>/ml mosott BaF3/MPLR1.1 sejthez. A vizsgálati sejteket 3 napig inkubáljuk 37 C° hőmérsékleten 5 % CO<sub>2</sub> alatt a proliferációs vizsgálat előtt.

Az MPL jelenlétében levő sejt szaporodás mennyiségi vizsgálatát egy kolorimetriás vizsgálattal határozzuk meg, mely a 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)2,5-difenil tetrazólium bromid (MTT) metabolikus lebontására alapul (Mosman, J. Immunol.



Meth. 65: 55-63, 1983). Az MTT 10 mg/ml oldatából (Poliscience Inc., Warrington, PA) 20 µl mennyiséget adunk BaF3/MPLR1.1 vizsgálati sejtek 100 µl mennyiségéhez, majd a sejteket 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk. Négy óra elteltével 200 µl izopropanolban levő 0,04 N HCl-t adunk hozzá, az elegyet összekeverjük és a minta abszorbanciáját 570 nm hosszúságon EL320 ELISA leolvasón (Bio-Tek Instruments INc., Highland Park, VT) leolvassuk.

Egy plazmid csoportot pozitívnak találtunk, ezt T1081-nek jelöljük, ezt a BHK 570 sejtekbe transzfektáljuk. A transzfektánsok felülűszója pozitív jelet ad az MTT proliferációs vizsgálatban. A PCR és az antitest semlegesítési kísérletek azt mutatják, hogy az aktivitás nem az IL-3-nak vagy az IL-4-nek köszönhető.

A pozitív csoportból származó plazmidokat használjuk az *E. coli* DH10B transzformálására és a sejteket kiszélesztjük (42 lemez megközelítően 15-20 telep/lemez, 10 lemez megközelítően 90 telep/lemez és 8 lemez megközelítően 250 telep/lemez sűrűséggel). Minden lemezből készítünk egy ismétlést és ezeket 4 C° hőmérsékleten tároljuk. Az eredeti lemezekben levő telepeket megkarcoljuk és több órán keresztül hagyjuk kinőni folyadék tenyészetben, majd DNS-t preparálunk.

Az alcsoportokból származó plazmid DNS-t BHK 570 sejtekbe transzfektáljuk. Megközelítően két óra elteltével az egyik alcsoportot (#22) pozitívanak értékeljük mikroszkópos vizsgálattal (megnyúlt sejt alak). Több órával később két további alcsoportot (#19 és #28) szintén pozitívnak értékelünk. Az egyes pozitív alcsoportok fennmaradó felülűszóit a kontrol BaF3 sejtekkel szemben vizsgáljuk és azt találtuk, hogy nincs aktivitásuk. Továbbá, a három pozitív alcsoportból származó aktivitást úgy tűnik, hogy az oldható I-es típusú MPL receptor gátolja.

A három pozitív alcsoport replika lemezeit több órán keresztül nőni hagyjuk, majd az egyes telepeket izoláljuk és 3 ml tenyészték inokulálására használjuk. A tenyészték körülbelül 8 órán keresztül szaporodnak 37 C° hőmérsékleten, majd a

DNS-t kipreparáljuk miniprep módszerrel a fent leírtak szerint. A plazmid DNS-t BHK 570 sejtekbe transzfektáljuk és a felülúszókat körülbelül 10 órával később összegyűjtjük és az aktivitást vizsgáljuk. Egy óra után egy klón (T1081-19-215-nek jelöljük, ez megfelel a #19 alcsoportnak) pozitívnak bizonyult. Ezt a klónt újra kiszélesztjük egyedüli telepek nyérése céljából. Tizenkét telepből DNS-t preparálunk és BHK 570 sejtekbe transzfektáljuk. Mind a 12 transzfektáns pozitívnak bizonyult a vizsgálatban. A 12 pozitív telep egyikéből származó DNS-t *E. coli* DH5alfa transzformálására használjuk. A plazmidot pZGmp1-1081-nek jelöljük. Ezt a transzformánst 1994 február 14-én deponáltuk az American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 69566 katalógusszám) törzsgyűjteményénél.

A hematopoietikus proteint (thrombopoietin) kódoló cDNS nukleotid szekvenciáját meghatározzuk (1. számú szekvencia). A kódolt aminosav szekvencia (2. számú szekvencia) analízise azt jelzi, hogy az érett protein amino terminusa a 45-ös aminosav maradéknál található. Az 1. számú szekvencia 105-ös és 174-es pozícióiban két metionin kódon van, melyek iniciációs kódonoknak tűnnek, a fő iniciációs hely a 174-es pozíciónál várható.

### 8. példa

#### A rekombináns thrombopoietin hematopoietikus aktivitása

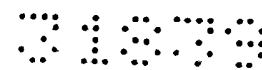
Csontvelőt gyűjtünk nőstény CD-1 vemhesség utáni egerek combcsontjából (femur) és sípcsontjából (tibia), majd 25 ml CATCH pufferbe (99 mg teofilin, 0,75 g nátrium citrát, 75 mg adenzin, 20 ml 10x Hank-féle egyensúlyi sóoldat  $Ca^{++}$   $Mg^{++}$ -mentes, 200 ml  $dH_2O$ , pH=7,4) helyezzük. A sejteket egysejt szuszpenzióvá szuszpendáljuk egy 25 ml-es pipettával való pipettázással. A térfogatot 50 ml értékre állítjuk CATCH pufferrel, majd a sejteket 1000 rpm fordulaton való 7 percig tartó centrifugálással pelletizáljuk. A pelletet 25 ml CATCH pufferben reszuszpendáljuk és

T75 szövettenyésztő lombikban inkubáljuk műanyag adhézió első köréig 37 C° hőmérsékleten 2 órán keresztül. A nem tapadó sejteket centrifugálással összegyűjtjük (1000 rpm fordulatszámon 7 perc) a sejtek pelletizálásával. A pelletet reszuszpendáljuk 15 ml alfa-MEM + 10% FBS (L-glutamin, Napiruvát, és PSN antibiotikumok) tápközegben és T75 lombikban inkubáljuk a műanyag adhézió második köréig a fent leírt első körnek megfelelően. Az utolsó centrifugálás és reszuszpendálás után a sejteket megszámloljuk. Az 576000 sejt/ml sejtek 0,5 ml mennyiségét 24 üregű szövettenyésztő lemezre szélesztjük a kontrol BHK sejtekről származó minta tápközeggel, vagy a pZGmp1-1081 plazmiddal transzfektált BHK sejtekről származó kondicionált tápközeggel együtt. Három napig tartó 37 C° hőmérsékleten való inkubálás után a sejteket összegyűjtjük és a fentiek szerint festjük.

A kontrol üregből 150 µl standard kondicionált tápközeggel kezelt sejtet gyűjtünk össze. 50 µl sejtet gyűjtünk össze abból az üregből, amit a pZGmp1-1081 plazmiddal transzfektált BHK sejtekből származó kondicionált tápközeggel kezeltünk. Ezeket a mintákat centrifugáljuk és standard mikroszkópos preparátumot készítünk.

A preparátumokat 100 % metanollal rögzítjük, majd 1:1 Wright-féle oldat(0,5 g Wright festék 300 ml metanolban)/H<sub>2</sub>O elegyével elárasztjuk 6 percig, vízzel mossuk és megszáritjuk. A preparátumokat ekkor Sorensen pufferben (2,28 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/2,38 g NaPO<sub>4</sub> 250 ml H<sub>2</sub>O-ban) Giemsa festékkel (Sigma Chemical Corp.) árasztjuk el, vízzel mossuk és megszáritjuk.

A használt térfogatokra való kiigazítás után a BHK/pZGmp1-1081 tápközeg minta 120 megakariocitát tartalmaz 150 µl térfogatonként a kontroll tápközeg 9 megakariocita/150 µl mennyiségéhez képest. Továbbá, a kezelt kísérleti mintában levő megakariocitákat mikroszkópos megfigyeléssel szignifikánsan nagyobbak



tűnnek, mint a kontrol sejtek, és szignifikánsan erősebben festődnek a polinukleusz tartalomra.

A mutáns BaF3/MPLR1.1 24-11-5#3 vonalból származó kondicionált tápközeget összegyűjtjük szérum hiányában és 20-szorosára koncentráljuk egy 10 Kd lyukméretű AAmicon Inc. (Beverly, MA) szűrő készüléken. Csontvelőt gyűjtünk egér combcsontból (femur) és Iscove-féle módosított Dulbecco-féle Tápközegben (GIBCO BRL) + 15 % magzati borjú szérum (FCS) elegyében szuszpendáljuk. A szuszpendálás után a nukleált (a sejtmaggal ellátott) sejteket megszámloljuk és 75000 sejt/ml mennyiségben 0,9 ml/lemez értéken szélesztjük olyan tápközegbe, melyt úgy állítottunk be, hogy 50 % metilcellulózt, 15 % FCS-t, 10 % BSA-t és 0,6 % PSN-t (félzilárd tápközeg) tartalmazzon 1 ml szövet tenyésztő lemezekben. Különböző kondicionált tápközeget és kontroll mintát adunk a teljes térfogat 1 ml értékre állítása céljából. A lemezeket 37 C° hőmérsékleten 5 % CO<sub>2</sub> alatt 6 napon keresztül inkubáljuk, majd mikroszkóposan megszámloljuk a granulocita/makrofág (GM) telepeket. A 24-11-5#3 kondicionált tápközeg jelenlétében inkubált lemezek gyenge GMCSF-szerű aktivitást mutatnak, a telepszám körülbelül 25, a 0 telepszámú negatív kontrol mintához képest, valamint a pozitív kontrollal stimulált lemezekben megfigyelhető 130 telepszámhoz képest (alkörmös mitogén lép kondicionált tápközeg (PWMSM)); amit úgy állítunk elő, hogy az aprított egér lépet egy héten keresztül alkörmös mitogén (a Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN szereztük be) + 2 U/ml eritropoietin jelenlétében inkubáltuk.

Csontvelőt gyűjtünk egér combcsontból (femur) és Iscove-féle módosított Dulbecco-féle Tápközegben (GIBCO BRL) + 15 % magzati borjú szérum (FCS) elegyében szuszpendáljuk, majd a sejtmaggal ellátott sejteket megszámloljuk és félzilárd tápközegre szélesztjük a fent leírtak szerint. A sejteket a pZGmp1-1081

plazmid által kódolt protein megakariocita telep képző aktivitás tesztelésére használjuk.

A pZGmp1-1081 plazmiddal stabilan transzfektált BHK 570 sejtek egy csoportját szérumban jelenlétében szaporítjuk és a kondicionált tápközeget összegyűjtjük. A kondicionált tápközeget magában és alkörmös mitogén lép kondicionált tápközeggel együtt, rekombináns egér IL-3-mal, IL-6-tal (Genzyme Corp. Cambridge, MA), IL-11-gyel (Genzyme Corp.) vagy ezen faktorok kombinációjával együtt teszteljük. A PWMSCM szolgál pozitív kontrollként. A nem kondicionált tápközeg szolgál negatív kontrollként.

A teszt vagy kontroll mintákat hozzáadjuk a csontvelő tenyészetéhez és a teljes térfogatot 1 ml értékre állítjuk. A lemezeket 6 napon keresztül inkubáljuk 37 C° hőmérsékleten 5 % CO<sub>2</sub> alatt, majd mikroszkóposan megvizsgáljuk a megakariocita telepek számát. Az eredményeket a 4. táblázat mutatja. Összefoglalásként, a BHK/pZGmp1-1081 kondicionált tápközeg mutat megakariocita telep képző aktivitást, amit a korai hatású faktorok jelenléte olyan szintekre fokoz, ami jelentősen magasabb, mint a bármelyik magában levő korai hatású faktor jelenlétében észlelt aktivitás.

4. táblázat

<u>Minta</u>	<u>megakariocita telepek</u>
Negatív kontroll	0
PWMSCM	7
BHK/pZGmp1-1081	2
BHK/pZGmp1-1081 + PWMSCM	15
IL-3	1
IL-3 + BHK/pZGmp1-1081	8
IL-6	0
IL-6 + BHK/pZGmp1-1081	6
IL-11	1
IL-11 + BHK/pZGmp1-1081	6

4. táblázat folytatása

IL-3 + IL-6	2
IL-3 + IL-6 + BHK/pZGmp1081	9
IL-3 + IL-11	5
IL-3 + IL-11 + BHK/pZGmp1-1081	15

A BHK/pZGmp1-1081 kondicionált tápközeg in vivo aktivitását egereken vizsgáljuk. Szérummentes tápközegét gyűjtünk és 5-szörösére koncentrálnak egy 10 Kd lyukméretű szűrő készüléken (Amicon Inc., Beverly, MA). A kontroll (nem kondicionált) tápközegét hasonló módon koncentrálnak be. Hat BALB/c egeret (Simonsen Laboratories, Inc., Gilroy, CA) kezelünk hét napi 0,5 ml kontroll anyag vagy kondicionált tápközeg intraperitoneális injektálásával. A 0., 3., és a 7. napon vérmintát vrszünk és a vérlemezkék számát megszámloljuk. Az 5. táblázatban bemutatott eredmények azt jelzik, hogy a BHK/pZGmp1-1081 sejtekről származó kondicionált tápközeg thrombopoietikus aktivitással rendelkezik.

5. táblázat

vérlemezke szám ( $10^4/\mu\text{l}$ )

<u>Kezelés</u>	<u>0. nap</u>	<u>3. nap</u>	<u>7. nap</u>
Kontroll	141	141	87
Kontroll	159	149	184
BHK/pZGmp1-1081	157	160	563
BHK/pZGmp1-1081	169	154	669
BHK/pZGmp1-1081	139	136	492
BHK/pZGmp1-1081	135	187	554

## 9. példa

### A humán thrombopoietin gén izolálása

Egy amplifikált humán tüdő Lambda FIX genom könyvtárat (Stratagene Cloning Systems) szkrinelünk a humán thrombopoietint kódoló génre próbaként az egér mpl receptor ligandum cDNS-t használva. A könyvtárat titereljük és 30 150 mm-es LE-392 *E. coli* sejtekkel (Stratagene Cloning Systems) inokulált lemezt fertőzünk  $4 \times 10^4$  plakk képző egységgel (PFU). A lemezeket egy éjszakán keresztül  $37\text{ C}^\circ$  hőmérsékleten inkubáljuk. Szűrőpapír plakk "lift"-eket készítünk HYBOND nylon membránokat (Amersham) használva a gyártó által javasolt eljárást követve. A szűrőket 1,5 M NaCl-t és 0,5 M NaOH-t tartalmazó oldatban 7 percig tartó denaturálással feldolgozzuk szobahőmérsékleten. A szűrőket rövid ideig lenyomatoljuk szűrőpapíron a feleslegben levő denaturációs oldat eltávolítása céljából, majd 5 percig 1 M Tris-HCl (pH=7,5) és 1,5 M NaCl elegyében semlegesítjük. A fág DNS-t a szűrőkre 1,200  $\mu\text{L}$  UV energiával rögzítjük egy STATALINKER UV keresztkötőn (Stratagene Cloning Systems). Fixálás után a szűrőket háromszor előmossuk 0,25 x SSC, 0,25 % SDS és 1 mM EDTA elegyében  $65\text{ C}^\circ$  hőmérsékleten. Előmosás után a szűrőket egy 0,45  $\mu\text{M}$ -os szűrőn átszűrt hibridizációs oldatban (5x SSC, 5x Denhardt-féle oldat, 0,2 % SDS és 1 mM EDTA) prehibridizáljuk. Hővel inaktivált nyírt lazac sperma DNS-t (a végső koncentráció 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) adunk hozzá közvetlenül felhasználás előtt. A szűrőket  $65\text{ C}^\circ$  hőmérsékleten egy éjszakán át prehibridizáljuk.

A pZGmp1-1081 plazmidból származó teljes hosszúságú egér TPO cDNS-t  $^{32}\text{P}$ -vel jelölünk random primeléssel MEGAPRIME DNS Labeling System-et (Amersham) használva a gyártók által javasolt módszernek megfelelően. A prehibridizációs oldatot friss hibridizációs oldatra cseréljük, ami megközelítően  $1 \times 10^6$  cpm próbát tartalmaz, majd egy éjszakán keresztül  $65\text{ C}^\circ$  hőmérsékleten hagyjuk

hibridizálódni. Hibridizálódás után a hibridizációs oldatot eltávolítjuk és a szűrőket négyszer vagy ötször mossuk 0,25 x SSC-t, 0,25 % SDS-t és 1 mM EDTA-t tartalmazó mosó oldatban. Mosás után a szűrőket egymás után 8-szor mossuk 50 C° hőmérsékleten mosó oldatban. Az utolsó mosás után a szűrőket autoradiográfiás filmre (XAR-5; Eastman Kodak Co., Rochester, NY) helyezzük 4 napra-70 C° hőmérsékleten intenzifikáló szkrinnel.

Az autoradiogramok vizsgálata több száz olyan régiót mutat, mely a jelölt próbával hibridizálódik. A 100 régióból az agar plakkokat kimetszük tisztítás céljából. Az egyes agar plakkokat egy éjszakára 1 ml 1 % (v/v) kloroformot (Maniatis et al., eds. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1982) tartalmazó SM-be meritjük. Az egy éjszakás inkubálás után az egyes plakkokról származó fágokat 1:1000 arányban hígítjuk SM-ben. 5 µl azonos mennyiségeket LE392 *E. coli* sejtekre szélesztünk. A lemezeket egy éjszakán keresztül 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk és szűrőpapír "lifteket" készítünk, előhibridizáljuk, mossuk és a fent leírt módon autoradiográfiának vetjük alá.

A kapott autoradiogramok vizsgálata erősen pozitív jeleket mutat két primer izolátum esetében és gyenge jeleket 18 másik esetében. Agar plakkokat gyűjtünk a pozitív területekről mind a 20 jel esetében. Az agar plakkokat a fent leírt módon kezeljük. Az egyes agar plakkokról eluált fágokat 1:100 arányban hígítjuk SM-ben és 1 µl mennyiségeket szélesztünk LE392 *E. coli* sejtekkel. A lemezeket inkubáljuk és fág szűrőpapír "lifteket" készítünk és hibridizáltatunk a fent leírtak szerint. A szűrőpapírokat 55 C° hőmérsékleten mossuk mosó pufferben. A szűrőpapírok autoradiogramjai az egyes, diszkrét fág plakkoknak megfelelő hibridizációs területeket fednek fel három eredeti izolátumból, a 8-3-2-ből, a 10-1-1-ből és a 29-2-1-ből.



A 8-3-2, a 10-1-1 és a 29-2-1 fág izolátumokat sorrendben lambda ZGmp1-H8-nak, lambdaZGmp1-H10-nek és lambdaZGmp1-H29-nek jelöljük. A lambda ZGmp1-H8, lambdaZGmp1-H10 és lambdaZGmp1-H29 izolátumokból származó DNS-t LAMBDAORB fág adszorbens (Promega Corp., Madison, WI) segítségével tisztítjuk a gyártók útmutatásának megfelelően. A fágból humán genom DNS inzertereket szeparálunk a fág vektor DNS-ből Xbal-gyel történő emésztéssel és agaróz gél elektroforézissel tisztítjuk. Mind a három fág izolátum tartalmaz olyan szekvenciákat, melyek az egér mpl receptor ligandum cDNS próbához hibridizálódnak, ahogy azt Southern lenyomat technikával kiderült (Maniatis et al., ibid.). A lambdaZgmp1-H8 fágot analizáljuk és a lambdaZGmp1-H8 hibridizálódó régióját úgy találtuk, hogy három, 9,5 kb, 2,5 Kb és 1 Kb hosszúságú Xbal DNS fragmenteken található. A 2,5 kb hosszúságú fragmentet a Xbal-gyel emésztett BLUESCRIPT II SK+ fágmidba (Stratagene Cloning Systems) szubklónozzuk a pZGmp1-H82.5 plazmid létrehozása céljából.

A humán TPO gén szekvenciája és a kódolt aminosav szekvencia a 28. számú és a 29. számú szekvenciákban került bemutatásra.

#### 10. példa

##### A teljes hosszúságú humán thrombopoietin cDNS izolálása

A teljes hosszúságú humán TPO-t kódoló cDNS-t polimeráz lánc reakcióval izoláljuk humán máj és vese cDNS templátokból specifikus primereket használva, melyek a pZGmp1-H82.5 plazmidon azonosított exon szekvenciákból származnak, valamint az egér TPO cDNS konzervált 5' nem transzlált szekvenciájából.

Humán vese, máj és tüdő poli d(T) szelektált poli(A)<sup>+</sup> RNS-eket (Clontech, Palo Alto, CA) használunk az első szál cDNS szintetizálásához. Az egyes reakcióelegyeket 4 µg poli(A)<sup>+</sup> RNS és 1 µg oligo d(T)<sub>18</sub> (Nincs 5' foszfát) mRNS

primer (New England Biolabs, Beverly, MA) használva 19 µl végtérfogatban. A reakcióelegyet 65 C° hőmérsékletre hevítjük 5 percig és jégen lehűtjük. A cDNS szintézist úgy indítjuk el, hogy hozzáadunk az egyes RNS-primer elegyekhez 8 µl 5x SUPERScript puffert (GIBCO BRL), 2 µl 100 mM ditiotreitolt, 2 µl mennyiséget az egyenként 10 µl dATP-t, dGTP-t, dTTP-t és dCTP-t tartalmazó dezoxiribonukleotid trifoszfát oldatból (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ), 2 µl 1 µCi/µl <sup>32</sup>P-alfa-dCTP-t (Amersham, Arlington Heights, IL) és 8 µl 200 U/µl SUPERScript reverz transzkriptázt (GIBCO BRL). A reakcióelegyet 45 C° hőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáljuk, majd 120 µl mennyiségre hígítjuk TE-vel (10 mM Tris:HCl, pH=8,0), 1 mM EDTA). A cDNS-t kétszer csapatjuk ki 50 µl 8M ammónium acetát és 160 µl izopropanol hozzáadásával. A kapott cDNS pelletet 10 µl TE-ben reszuszpendáljuk. Az egyes reakcióelegyek első szál cDNS hozamát a <sup>32</sup>P-dCTP beépülés szintjéből becsüljük meg.

A máj, tüdő és vese cDNS-ből származó első szál cDNS-t használjuk két cDNS szegment, a szekvencia N-terminális egy-harmadának és a C-terminális két-harmadának létrehozására különböző polimeráz lánc reakciót használva. Egy KpnI restriktációs helyet juttatunk be a cDNS szegmentekbe a genom szekvenciából való egyedüli bázis cserével PCR mutagenézis segítségével a ZC7422 (20. számú szekvencia) és a ZC7423 (21. számú szekvencia) primerek felhasználásával. A kapott nukleotid változás egy közös KpnI restriktációs helyet hoz létre a jósolt aminosav kódolásban való változás nélkül.

Az N-terminális szegmentet egy 50 µl 5 ng templát cDNS-t (külön reakcióelegy a vese, a máj és a tüdő cDNS-ek esetében), 80 pmol ZC7424 (22. számú szekvencia) és 80 pmol ZC7422 (20. számú szekvencia) oligonukleotidot, 5 µl 2,5 mM dezoxiribonukleotid trifoszfát oldatot (Cetus Corp., Emeryville, CA), 5 µl 10x PCR puffert (Promega Corp., Madison, WI) és 2,5 egység Taq polimerázt

(Boehringer Mannheim Corp.) tartalmazó reakcióelegyben amplifikáljuk. A polimeráz lánc reakciót 35 ciklusban futtatjuk (1 percen keresztül 94 C° hőmérsékleten, 1 percen keresztül 58 C° hőmérsékleten és 1,5 percen keresztül 72 C° hőmérsékleten), majd 7 percen keresztül 72 C° hőmérsékleten inkubáljuk. A ZC7424 (22. számú szekvencia) sense primer áthidalja az egér mpl receptor ligandum 5' nem transzlált régiót és magába foglalja az ATG iniciációs kódont. A ZC7422 (20. számú szekvencia) antisense primer a humán genom TPO DNS 4-es és 5-ös exonjainak megfelelő régiókból származó szekvenciákat foglal magába.

A C-terminális szegmentet egy 50 µl 5 ng templát cDNS-t (külön reakcióelegy a humán vese, a máj vagy a tüdő cDNS-ek esetében, ahogy fent leírtuk), 80 pmol ZC7423 (21. számú szekvencia) és 80 pmol ZC7421 (23. számú szekvencia) oligonukleotidot, 5 µl 2,5 mM dezoxiribonukleotid trifoszfát oldatot (Cetus Corp.), 5 µl 10x PCR puffert (Promega Corp.) és 2,5 egység Taq polimerázt (Boehringer Mannheim Corp.) tartalmazó reakcióelegyben amplifikáljuk. A polimeráz lánc reakciót 35 ciklusban futtatjuk (1 percen keresztül 94 C° hőmérsékleten, 1 percen keresztül 65 C° hőmérsékleten és 1,5 percen keresztül 72 C° hőmérsékleten), majd 7 percen keresztül 72 C° hőmérsékleten inkubáljuk. A ZC7423 (21. számú szekvencia) sense primer a humán genom TPO DNS 4-es és 5-ös exonjainak megfelelő régiókból származó szekvenciákat foglal magába. A ZC7421 (23. számú szekvencia) antisense primer magába foglalja a humán gén 3' nem kódoló szekvenciájának megfelelő régióból származó szekvenciát, valamint a transzlációs terminációs kódont.

Az amplifikált PCR termékeket közvetlen DNS szekvenálással analizáljuk és a pGEM-T (Promega Corp.) plazmidba szubklónozzuk további analízis céljából az egér cDNS szekvenciához és a humán genom szekvenciákhoz való hasonlításal. Egy a humán TPO-t kódoló DNS szekvenciát mutatunk be a 18. számú

szekvenciában és a kódolt aminosav szekvenciát a 19. számú szekvenciákban mutatjuk be. A szekvencia analízis azt jelzi, hogy a jel peptid hasítás a 22-es aminosavnál következik be (19. számú szekvencia) és az érett protein a 22-es aminosavnál kezdődik (19. számú szekvencia).

A humán N-terminális és C-terminális PCR fragmenteket EcoRI-KpnI fragmentekként metszük ki a pGEM-T plazmidból és a Zem229R expressziós vektor EcoRI helyére ligáljuk. Ezt a plazmidot transzfektáljuk a BHK 570 sejtekbe Lipofectamint (GIBCO BRL) használva. A transzfekció után 24 órával a tenyésztápközeget (DMEM + PSN + 10 % FCS) friss tápközeggel helyettesítjük és a sejteket 48 órán keresztül szelektív anyag hiányában inkubáljuk. A kondicionált tápközeget proliferatív aktivitásra vizsgáljuk BaF3/MPLR1.1 sejteket használva a korábban leírtak szerint. Az eredmények világosan megmutatják, hogy a tápközegben a humán TPO stimulálja az egér MPL receptort expresszáló BaF3 sejtek szaporodását.

cDNS-t állítunk elő a humán máj és vese mRNS-ből (Clontech Laboratories, Inc.-től szerezzük be) SUPERSRIPT reverz transzkriptázt használunk a gyártók útmutatásának megfelelően. Ezután máj és vese eredetű humán TPO DNS klónokat állítunk elő két PCR reakciót használva (a körülményeket a 6. táblázat mutatja). A reakciókat 35 cikluson keresztül futtatjuk 94 C° hőmérsékleten 1 percig, 58 C° hőmérsékleten 1 percig, 72 C° hőmérsékleten 1,5 percen keresztül, majd egy 7 perces 72 C° hőmérsékleten történő inkubálás következik.

## 6. táblázat

## 1. számú reakció:

5 ng máj vagy vese cDNS

4 µl ZC7454 oligonukleotid (20pM/µl)(24. számú szekvencia), az ATG-től 5' irányban egy EcoRI helyet juttat be)

4 µl ZC7422 oligonukleotid (20 pM/µl)(20. számú szekvencia) egy Asp718 helyet hoz létre)

5 µl dNTP oldat, ami a következőket tartalmazza: 2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dCTP és 2,5 mM dTTP

5 µl 10x Taq puffer (Boehringer Mannheim Corp.)

1 µl Taq polimeráz (Boehringer Mannheim Corp.)

30 µl H<sub>2</sub>O

## 2. számú reakció:

5 ng máj vagy vese cDNS

4 µl ZC7423 oligonukleotid (20pM/µl)(20. számú szekvencia), egy Asp718 helyet hoz létre)

4 µl ZC7453 oligonukleotid (20 pM/µl)(25. számú szekvencia) a TGA-tól 3' irányban egy EcoRI helyet hoz létre)

5 µl dNTP oldat, ami a következőket tartalmazza: 2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dCTP és 2,5 mM dTTP

5 µl 10x Taq puffer (Boehringer Mannheim Corp.)

1 µl Taq polimeráz (Boehringer Mannheim Corp.)

30 µl H<sub>2</sub>O

A PCR termékeket fenol/kloroform/izoamil alkohol elegyével kezeljük és 95 %-os ETOH-val kicsapatjuk, megszáritjuk és 20 µl vízben reszuszpendáljuk. Az egyes termékeket ezután Asp718 és EcoRI restrikciós enzimekkel hasítjuk 1 %-os agaróz gélen. Az 1-es számú reakcióból származó 410 bázispár hosszúságú fragmenteket (máj és vese) és a 2-es számú reakcióból származó 699 bázispár hosszúságú fragmenteket (máj és vese) kimetszük a gélből és a gél lapokból nylon gyapjún keresztül centrifugálással eluáljuk. Az 1-es számú és a 2-es számú reakciók PCR termékeit az EcoRI-gyel hasított Zem229R vektorral (Az American Type Culture

Collection 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD törzsgyűjteménynél került deponálásra 1993 szeptember 28-án; 69447 katalógusszám) egymáshoz ligáljuk így a két terméket egymáshoz kapcsoljuk a létrehozott Asp718 helynél. A kapott plazmidot 10-es számmal (a vese eredetű cDNS-t tartalmazza) és 28-as számmal jelöljük (a mák eredetű cDNS-t tartalmazza).

A cDNS-eket szekvenálva egyszeri PCR által létrehozott hibákat találtunk az egyedüli AvrII hely 5' és 3' végeinél sorrendben a 28-as számú és a 10-es számú plazmidokban. Egy hiba mentes TPO DNS létrehozásához egy 826 bázispár hosszúságú EcoRI-AvrII 5' fragmentet izolálunk a 10-es számú plazmidból és egy 283 AvrII-EcoRI 3' fragmentet a 28-as számú plazmidból. A két fragmentet egymáshoz ligáljuk az EcoRI-lyel hasított Zem229R vektorral. A kapott plazmidot pZGmpl-124 plazmidnak nevezzük. Ezt a plazmidot az American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD) törzsgyűjteménynél deponáltuk 1994 május 4-én; egy *E. coli* DH10b transzformánsként 69615 katalógusszámon.

### 11. példa

#### Megakariocita cDNS könyvtár

A megakariocita prekursorok in vivo amplifikálásához 20 egeret injektálunk interperitoneálisan 40000 aktivitás egységgel (az egység definíciója: 50 U/ml a BaF3/MPLR1.1 sejtek 0,5 maximális szaporodási rátához a rekombináns patkány trombopoietin napi MTT vizsgálatban (7-es példa) (koncentrált szérum mentes kondicionált tápközeg az egér trombopoietin cDNS-sel stabilan transzfektált BHK 570 sejtekről). Az injektálás 5. napján a lépeket eltávolítjuk és CATCH puffer + Hepes (Hank-féle egyensúlyi sóoldat (HBSS), kalcium és magnézium mentes, 10 mM Hepes (GIBCO BRL), 1,4 mM adenzin, 2,74 mM teofillin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) és 0,38 % nátrium citrát (J.T. Baker Inc., Philipsburg, NJ) pH=7,40

nátrium hidroxiddal állítjuk be) elegyébe helyezzük. Egyidőben 5 lépet dolgozunk fel, bemetszve mindegyiket és a sejteket kifolyatva két rozsdamentes acél szűrő között CATCH puffer és Hepes elegyébe. A sejtcsomók egy részének 25 ml-es pipettával való széttörése után a térfogatot 50 ml mennyiségre növeljük és a sejteket 7 percig 208 x g értéken lecentrifugáljuk egy Sorval TJ-6 centrifugán. Az egyes sejt pelleteket 10 ml CATCH puffer + Hepes elegyében reszuszpendáljuk és 130 µm-es nylon szűrőn átszűrjük egysejt szuszpenzió nyerése céljából. A térfogatot 50 ml mennyiségre állítjuk CATCH puffer + Hepes elegyével és a sejteket 15 percig centrifugáljuk 33 x g értéken. A sejteket további 50 ml CATCH + Hepes elegyének hozzáadásával mossuk és 10 percig 33 x g értéken centrifugáljuk. A sejt pelleteket 10 ml CATCH puffer + Hepes elegyében reszuszpendáljuk és egy három lépéses Percoll (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) gradiensen (65, 40 és 27 % 1 x CATCH puffer + Hepes elegyében, egyenként 12 ml 50 ml-es centrifuga csövekben) és 45 percen keresztül 833 x g értéken centrifugáljuk. A 40 és 63 %-os Percoll rétegek közötti sejteket összegyűjtjük és a térfogatot 50 ml mennyiségre állítjuk CATCH puffer + Hepes elegyével. A sejteket 7 percen keresztül 208 x g értéken centrifugáljuk és 50 ml megakariocita szaporító tápközegben (minimál esszenciális tápközeg alfa módosítás, ribonukleotid és dezoxiribonukleotid mentes, 15 % hőinaktivált magzati borjú szérummal, 2 mM L-glutamáttal (a tápközeg alkotórészeket a JRH Bioscience, Lenexa, KS-től szerezzük be), 1 mM nátrium piruvát (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 1 x PSN antibiotikum keverék (GIBCO BRL) és 1000 aktivitás egység rekombináns patkány thrombopoietinnel/ml (szérummentes kondicionált tápközeg az egér thrombopoietin cDNS-sel stabilan transzfektált BHK 570 sejtekről). A sejteket ezután 150 mm-es szövettenyésztő lemezekre szélesztjük  $10^6$  mononukleált sejt/ml sűrűségben és teljes páratartalmú inkubátorban szaporítjuk 6 % CO<sub>2</sub> alatt 37 C° hőmérsékleten. Három napos szaporítás után a

nem adherens sejteket összeegyűjtjük 50 ml-es centrifuga csövekben és jégen lehűtjük. A nagy sejteket 33 x g értéken való centrifugálással pelletáljuk 15 percen keresztül 4 C° hőmérsékleten. A sejt pelletet 50 ml CATCH puffer + Hepes elegyében reszuszpendáljuk szobahőmérsékleten és 10 percen keresztül 33 x g értéken centrifugáljuk. (Az összes további lépést szobahőmérsékleten végezzük.) Ezt a mosást megismételjük az érett megakariociták nagyobb tisztaságának elérése céljából. A maradék sejteket 15 ml CATCH puffer + Hepes elegyében (összegyűjtött térfogat) reszuszpendáljuk és három magzati borjú szérum lépés grádiensre (65 % és 40 % CATCH puffer + Hepes elegyével hígított)(JRH Biosciences) rétegezzük a rétegezéshez 1 x g értéken 30 percen keresztül. Az alul levő 65 %-os frakció 5 ml mennyiségét összegyűjtjük CATCH puffer + Hepes elegyével 50 ml mennyiségre hígítjuk és 10 percen keresztül 33 x g értéken centrifugáljuk. A pellet több mint  $10^7$  sejtet tartalmaz. A sejteket acetil-kolin ószterázra vizsgáljuk a Burstein et al (J. Cell. Physiol. 122:159-165, 1985) módszernek megfelelően és a meghatározás szerint ezek érett megakariocita sejtek 99 %-osnál nagyobb tisztasággal. A pelletizált sejteket ezután lizáljuk guanidium tiocianát/2-merkaptotanol elegyében az RNS cézium klorid denzitás grádienses centrifugálásával történő izolálásához.

A megakariocita RNS-ből a cDNS-t a fenti 6. példában leírtak szerint állítjuk elő.

## 12. példa

### A humán thrombopoietin gén fluoreszcenz in situ hibridizációs térképezése

A jégen levő mikrocentrifuga csövekbe a következő anyagokat adjuk: 1 µg a humán thrombopoietin gént tartalmazó lambdaZGmp1-H8-at, lambdaZGmp1-H10-et vagy lambdaZGmp1-H29-et, 5 µl 10x nick transzlációs puffert (0,5 M Tris/HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mg/ml BSA (nukleáz mentes)), 5 µl dNTP oldatot, ami 0,5 mM



dAATP-t, 0,5 mM dCTP-t, 5  $\mu$ l Bio-11-dUTP-t (5-(N-[N-biotinil-epszilon-aminokaproil]-3-amino-allil)-2'-dezoxiuridin 5'trifoszfát, Sigma Chemical Co.), 5  $\mu$ l 100 mM DTT-t, 5  $\mu$ l DN-ázt (egy 10 U/ $\mu$ l törzsoldatból 1000-szeres hígítás, (Boehringer Mannheim Corp.), RN-áz mentes), 2.5  $\mu$ l DNS-polimeráz I (5 U/ $\mu$ l, Boehringer Mannheim Corp.), H<sub>2</sub>O 50  $\mu$ l végtérfogatig. Keverés után, a reakcióelegyet 15 C° hőmérsékleten inkubáljuk 2 órán keresztül egy Boekel mikrohűtőben. A reakciót úgy állítjuk le, hogy hozzáadunk 5  $\mu$ l 0,5 M EDTÁ-t (pH=7,4) a reakcióelegyhez. A próbákat tisztítjuk Sephadex G-50 DNS tisztítási forgó oszlopokat (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ.) használva a gyártók útmutatásának megfelelően. A jelölt próbák méretének ellenőrzése céljából az egyes próbák 5-10  $\mu$ l mennyiségét 5  $\mu$ l géln terheléses pufferral (12,5% ficoll, 0,2% brómfenol kék, 0,2 M Tris-acetát, 0,1 M nátrium acetát, 1 mM EDTA) keverjük össze és egy 0,7% agaróz mini gélen futtatjuk át 80 V mellett. A lambda-HindIII fragmenteket (GIBCO BRL) és a fiX-HaeIII fragmenteket (GIBCO BRL) bázispárként méret markerként használjuk. Egy a 3-as kromoszómához specifikus digoxigén-jelölésű centromer próbát nyerünk Oncor-ból (Gaithersburg, MD).

Metafázisos kromoszómát nyerünk egy HEL sejttenyésztéből. 100  $\mu$ l Colcemidet (GIBCO BRL, 10  $\mu$ g/ml törzsoldat) adunk a sejt tenyésztéshez használt 100 x 15 mm-es petricsészében levő tápközeghez és 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk. 2,5-3 óra után a tápközegét a petri csészéből eltávolítjuk 10 ml-es műanyag steril pipettát használva és átvisszük egy 15 ml-es polipropilén kúp alakú kémcsőbe (Blue Max, Becton Dickinson). 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,2) 2 ml mennyiségét adjuk a petri csészéhez tisztítás céljából 5 ml steril műanyag pipettát használva és a kúp alakú kémcsőbe visszük át. 2 ml tripszint (GIBCO BRL, törzs oldat) adunk a petri csészéhez 5 ml-es műanyag steril pipettát használva, majd a petri csészét óvatosan megrázzuk és 3-5

percre egy 37 C° hőmérsékletű inkubátorba helyezük. A sejteket ezután a petricsészéből kimossuk 5 ml-es műanyag steril pipettát használva és a tápközeget tartalmazó kémcsőbe helyezük. A tenyésztési kémcsövet 250 x g értéken 8 percen keresztül centrifugáljuk és 0,5 ml mennyiség kivételével a felülúszót eltávolítjuk. A pelletet rázogatással reszuszpendáljuk, majd lassan és óvatosan 8 ml 0,075 M KCL-t (37 C° hőmérsékletűre előmelegített) adunk hozzá. A szuszpenziót óvatosan összerázzuk és 37 C° hőmérsékletű vízfürdőbe helyezük 10 percre. Az oldatot 250 x g értéken 5 percig centrifugáljuk és 0,5 ml kivételével a pellet feletti felülúszót eltávolítjuk. A pelletet a kémcső rázogatásával reszuszpendáljuk. Cseppenként 2 ml hideg metanol:ecetsav (3:1) elegyét adjuk hozzá rázatás mellett a sejtek fixálása céljából. Így módon a fixáló összesen 8 ml mennyiségét adjuk hozzá. A kémcsövet 20 percre hűtőszekrénybe helyezük, majd 5 percig centrifugáljuk 250 x g értéken. A felülúszót ismét eltávolítjuk és a rögzítési folyamatot még kétszer megismételjük. 25 x 75 mm-es előtisztított, fagyasztott üveg tárgylemezen (VWE Scientific, Media, PA) levő metafázis kenet fixálásához, 5 µl 50%-os ecetsavat csöppentünk az egyes tárgylemezekre egy 20 µl-es Pipetmannal (Gilson Medical Electronics, Inc., Middleton, WI), majd 5 µl sejt szuszpenziót adunk hozzá. A lemezeket hagyjuk megszáradni, majd egy éjszakán keresztül 43 C° hőmérsékletű sütőbe (Boeckel Industries Inc., Philadelphia, PA) tesszük használat előtt. A megfelelő metafázis kenetekre értékeljük a lemezeket egy fázis kontraszt kondenzátorral felszerelt mikroszkópot használva. Néhány metafázisú kromoszóma készítményt Gurr-féle kifejlesztett R66 Giemsa-féle festékekkel (BDH Ltd, Dorset, England) G-sávozunk, fotografálunk és a hibridizációs kísérletek előtt festékmentesítünk. A humán metafázisú kenetekkel ellátott tárgylemez készítményeket 2 órán keresztül 2 x SSC-ben (0,3 ; NaCl, 0,03 M nátrium citrát, pH=7,0) inkubáljuk, rövid ideig vízben öblítjük és 1:4 arányban Giemsa puffer oldattal (pH=6,5, BDH Ltd.) hígított Gurr-féle Giemsa

festékekkel megfestjük, majd használat előtt Whatmann #1 szűrőpapíron szűrjük. Néhány készítményt először 45 perc - 1 órán keresztül 90 C° hőmérsékleten inkubálunk, majd az SSC-ben való inkubálás előtt lehűtjük. Ezután a készítményeket Giemsa puffer oldatban differenciáljuk, vízzel mossuk és megszáritjuk. A megfelelő G-sávozású metafázisú kromoszóma keneteket lefényképezzük Kodak Ektachrome 400 dia filmet használva egy Olympus mikroszkóp segítségével, digitalizáljuk és egy Optronics (Goleta, CA) ZVS-47E CCD RGB színes video kamera rendszert és Optimus softwaret (BioScan Inc., Edmonds, WA) használva tároljuk. A készítményeket körülbelül 20 percig festékmentesítjük 100 % EtOH-ban, majd levegőn megszáritjuk a további használat előtt. A fel nem használt metafázisú kromoszóma lemez készítményeket -70 C° hőmérsékleten tároljuk.

Hibridizációs keverékeket készítünk 1,5 ml steril mikrocentrifuga csövekben 2,5 µg verseny DNS (Cot-1 DNS, GIBCO BRL), 40-60 ng biotin-jelölésű lambdaZGmp1-H8, lambdaZGmp1-H10 vagy lambdaZGmp1-H29 fág (a humán thrombopoietin gént tartalmazza), 7 µg hordozó DNS (denaturált lazac testis (testes) DNS, Sigma Chemical Co.), 1 ml 3 M NaOAc összekeverésével és 2 térfogat etanol vákuum szárítunk egy speedvac koncentrátorban. A pelletet 10 µl hibridizációs oldatban (10 % dextrán szulfát, 2 x SSC és 50 % formamid (EM Science, Gibbstown, NJ)) feloldjuk. A próbát és a kompetitor DNS-t 70-80 C° hőmérsékleten 5 percig denaturáljuk, jégen lehűtjük és 37 C° hőmérsékleten preanneáljuk 1-2 órán keresztül. A kromoszómák denaturálását az egyes lemezek 70 %-os formamid, 2 x SSC elegyében 70-80 C° hőmérsékleten 5 percig tartó merítésével érjük el, majd azonnal lehűtjük jég hideg 70 %-os etanolban, majd egyenként 5-10 percre 100 %-os etanolba helyezzük. Ezután a lemezeket levegőn megszáritjuk és 42 C° hőmérsékletűre melegítjük a hibridizációs keverék lemezekre való pipettázása előtt, amihez 20 µl-es Gilson Pipetman-t használunk. A hibridizációs keveréket és a



kromoszómákat ezután 18x18 mm-es No1 fedőlemezekkel (VWR Scientific) lefedjük. A hibridizáció egy éjszaka alatt megy végbe 37 C° hőmérsékleten nedveskamrában. Bizonyos esetekben, körülbelül 6 órás hibridizációs idő után 5 - 10 ng denaturált, digoxigenin-jelölt D3Z1 centomera próbát (10 % dextranszulfát, 2 x SSC és 65% formamid elegyét tartalmazó hibridizációs oldatban) adunk a készítményekhez.

A fedőlemezek eltávolítása után a tárgylemezeket 3 x 5 percig mossuk 50 %-os formamid, 2 x SSC elegyében 42 C° hőmérsékleten, 3 x 5 percig 2 x SSC-ben 42 C° hőmérsékleten és 1 x 3 percig 4 x SSC, 0,05 % polioxietilénszorbitán monolaurát (Tween-20, Sigma Chemical Co.) elegyében. Ezt egy 20 percig tartó preinkubálás követi 5 % zsírmentes száraz tejet tartalmazó 4 x SSC-ben nedveskamrában (100 µl egy 24 x 50 mm-es fedőlemez alatt). A kromoszóma 3 D3Z1 centomer próbát magába foglaló készítményekhez ezután egy 45 perces inkubálás következik egy 4 x SSC/5 % BSA elegyében levő 1:100 hígítású biotin-jelölt, egér anti-digoxin (Sigma Chemical Co) hígításában, ezt három 3-perces mosás követi 4 x SSC, 0,05 % Tween-20 elegyében. Ezután a post hibridizációs lépések következnek az összes készítmény esetében, egy 20 percig tartó fluoreszcensz jelölésű avidinnel (Fluorescein Avidin DCS, Vector laboratories, Burlingame, CA) (100 µl, 5 µg/ml, 4 x SSC, 5 % zsírmentes száraz tej elegyében) való inkubálással egy 24 x 50 mm-es fedőlemez alatt. A lemezeket ezután 3 x 3 percig mossuk 4 x SSC, 0,05 % Tween-20 elegyében, majd 20 percig inkubáljuk biotinilált kecske anti-avidin D-vel (affinitás tisztított, Vector Laboratories)(5 µg/ml 4 x SSC, 5 % zsírmentes száraz tej elegyében) egy 24 x 50 mm-es fedőlemez alatt. A lemezeket ismét 3 x 3 percig mossuk 4 x SSC, 0,05 % Tween-20 elegyében, majd újra fluoreszcein jelölésű avidinnel inkubáljuk (100 µl/ml 4 x SSC, 5 % zsírmentes száraz tej elegyében) egy 24 x 50 mm-es fedőlemez alatt. Bizonyos esetekben a jel amplifikációs eljárást még egyszer megismételjük. A végső mosást 2 x 3 percig végezzük 4 x SSC, 0,05

Tween-20 elegyében és 1 x 3 percig 1 x PBS-ben. A lemezeket szintartó tápközegbe helyezzük, mely 9 rész glicerolt (2 % 1,4-diazobiciklo-(2,2,2)-oktán, DABCO, 70 C° hőmérsékleten felolvasztva) és egy rész 0,2 M tris/HCl-t (pH=7,5) és 0,25-0,5 µg/ml propidium jódidot tartalmaz. A lemezeket egy BH2-RFC reflektált fény fluoreszcens kapcsolódású, egy PM-10 ADS automata fotomikrográf rendszerrel, egy Optronics ZVS-47E CCD RGB színes video kamera rendszerrel és egy Chroma Technology Corp. (Brattlebow, VT) FITC megjelenítéshez való FITC/Texas vörös szűrő sorozattal felszerelt Olympus BH2 mikroszkópon vizsgáljuk. A metafázisú kromoszóma kenetek képeit digitalizáljuk és egy Optronocs video képalkotó kamera rendszer és Optimus software segítségével tároljuk.

A fizikai feltérképezésből származó előzetes eredmények azt jelzik, hogy a humán thrombopoietin gén lokusz a 3-as kromoszóma q karján távol helyezkedik el a 3q26 régióban.

### 13. példa

#### Az egér TPO citokin domén *Saccharomyces cerevisiae*-ben való expressziója

A pBJ3-5 plazmid tartalmazza a *S.cerevisiae* TPI1 promótert, az alfa-faktor szekréciós vezetőt, az egér TPO kódoló szekvenciát (1. számú szekvencia) a 237-692 bázispárig, a TPI1 transzkripció terminátort, az élesztőgombában való replikációhoz való 2µ szekvenciákat és az élesztőgombában való szelekcióhoz megfelelő *Schizosaccharomyces pombe* trioz foszfát izomeráz gént (POT1 gén). Ezt a plazmidot úgy terveztük, hogy a 2. számú szekvencia 45-196 aminosavjait tartalmazó egér TPO protein szekrécióját irányítsa.

A pBJ3-5 plazmid megszerkesztéséhez a pMVR1 plazmidot (2. ábra) SphI-gyel és XbaI-gyeél emésztjük és a TPI1 promóter 5' régióját és a TPI1 terminátort

tartalmazó vektor gerincet kinyerjük. Ezután a következő fragmenteket inzertáljuk a vektor gerincébe:

1) Egy a pBS114 plazmidból származó SphI/HindIII fragmentet, mely a TPI1 promóter 3' régióját és az alfa-faktor vezetőt tartalmazza. a pBS114 plazmid egy élesztőgomba hordozó vektor, mely a TPI1 promótert és az alfa-faktor vezetőt tartalmazza, melyet egy a HindIII helyet magába foglaló polilinker szekvencia követ.

2) Egy PCR által létrehozott HindIII/Sall fragmentet, mely tartalmaz egy HindIII helyet - melyet úgy terveztünk meg, hogy kereten belül legyen a HindIII hellyel az alfa-faktor vezetőben - egy Kex2 proteolitikus hasítási helyet és az 1. számú szekvencia 237-335 bázispárjait magába foglaló egér TPO szekvenciát.

3) Egy az 1. számú szekvencia 336-692 bázispárjait magába foglaló egér TPO-t tartalmazó Sall/EcoRI fragmentet, mely a pSL-MPL-100 plazmidból származik (a pZGmp1-1081 plazmid amplifikálásával szerkesztettük meg a ZC7319 (27. számú szekvencia) és a ZC7318 (26. számú szekvencia) primereket használva, az EcoRI-gyel emésztve és a TPO citokin domén szekvenciát és az 5' nem kódoló szekvenciát tartalmazó fragmentet a Zem229R (ATCC 69447) EcoRI helyére klónozva). Ezt a fragmentet egy Sall/XbaI fragmentre cseréljük úgy, hogy a pIC19H plazmidba klónozzuk, melyet először Sall-gyel és EcoRI-gyel emésztettünk.

A kapott, pBJ3 jelölésű plazmidot (2. ábra) ezután BglII-vel és XhoI-gyel emésztjük a promótert, a vezetőt, a TPO-t kódoló szekvenciát és a terminátort tartalmazó teljes expressziós kazetta felszabadítása céljából. Ezt a BglII/XhoI fragmentet a pRPOT plazmidba (az 5,128,321 számú US szabadalomban került

leírásra, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak) inzertáljuk, melyet BamHI-gyel és XhoI-gyel emésztettünk. A kapott plazmidot pBJ3-5-nek jelöljük.

A JG134 *S.cerevisiae* törzset (MAT $\alpha$ , ura3-52 leu2-delta2, pepe-delta1 deltatpi1::URA3 [cir<sup>0</sup>]) pBJ3-5 plazmiddal és a pRPOT plazmiddal transzformáljuk litium acetátos eljárással (ahogy az általában leírásra került Ito et al által - J. Bacteriol. 153:163-168, 1983). A transzformánsokat a glükózt tartalmazó tápközegen való szaporodásuk alapján szelektáljuk. A JG134/pBJ3-5 és a JG134/pRPOT törzseket YEPD folyékony tápközegen szaporítjuk 3 napon keresztül. A tenyésztési tápközéget a sejtektől centrifugálással szeparáljuk és sejt proliferációs vizsgálatban analizáljuk az MPL receptort tartalmazó BaF3 sejtekben. A JG134/pBJ3-5 törzsről származó tápközeg 5000-7000 egység/ml TPO aktivitást tartalmaz, míg a negatív kontroll JG134/pRPOT nem rendelkezik aktivitással. Ez a z eredmény azt jelzi, hogy az élesztőgomba a TPO biológiailag aktív formáját képes szekretálni.

#### 14. példa

##### A rekombináns humán TPO aktivitása

Plazmid DNS-t állítunk elő pZGmp1-124 plazmiddal transzformált egy éjszakán át tenyésztett baktérium tenyészet 5 ml mennyiségéből alkalikus sejt lizissel, majd a DNS egy gyantához kötésével magas sótartalom mellett (Magic Minipreps Sampler kitet használva a Promega Corp.-tól). A DNS-t 75  $\mu$ l 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH=8,0, elegyével eluáljuk.

Az 50000 sejt/üreg denzitású BHK 570 sejt tenyészetet pZGmp1-124 DNS-seé transzfektáljuk. LIPOFECTAMINE (GIBCO BRL) 1:10 arányú hígításának 20  $\mu$ l mennyiségét adjuk 20  $\mu$ l plazmid DNS és 160  $\mu$ l szérum mentes tápközeg ( 10  $\mu$ g/ml fetuinna, 2 ng/ml szelén, 5  $\mu$ g/ml inzulin, 10  $\mu$ g/ml transzferin, 2 mM L-glutaminnal, 110  $\mu$ g/ml nátrium piruváttal, 25 mM HEPES-sel valamint 0,1 mM nem

esszenciális aminosav oldattal (GIBCO BRL) kiegészített F/DV tápközeg [DMEM és Ham-féle tápközeg 1:1 arányú keveréke]) elegyéhez 30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk a BHK 570 sejtek hozzáadása, valamint a 4 órán keresztüli 37 C° hőmérsékleten való inkubálás előtt. Ezután 200 µl Szaporító Tápközeget (2 mM L-glutaminnal, 110 µg/ml nátrium piruváttal, 0,05 mg/ml penicillinnel, 0,05 mg/ml sztreptomycinnel, 0,01 mg/ml neomycinnel, 25 mM HEPES-sel, 10 % magzati borjú szérummal kiegészített DMEM (Biowhittaker)) hozzáadjuk és a sejteket 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk egy éjszakán keresztül. Ezután a tenyész tápközeget 5 % magzati borjú szérumot tartalmazó Szaporító Tápközegre cseréljük és 37 C° hőmérsékleten 4 órán keresztül inkubáljuk.

A BHK 570 transzfektánsokról származó kondicionált tápközeget ezután az egér MPL receptort expresszáló BaF3 sejtek sejt szaporodását okozó képességére vizsgáljuk. A sejteket BaF3 tápközegben (10% magzati borjú szérummal, 2 mM L-glutaminnal, 1 mM nátrium piruváttal, 10 mM HEPES-sel, 57 µM beta-merkaptoetanollal, 0,05 mg/ml penicillinnel, 0,05 mg/ml sztreptomycinnel, 0,01 mg/ml neomycinnel és WEHI-3 sejtekről (egér interleukin-3, tenyészet kiegészítő, Collaborative Biomedical Products) származó 4 % V/V kondicionált tápközeggel kiegészített RPMI 1640 tápközeg (JRH Bioscience)) szaporítjuk. A vizsgálat előtt a BaF3 sejteket hígítjuk és IL-3 mentes BaF3 tápközegben reszuszpendáljuk 10000 sejt/100 µl sűrűségre. A pZGmp1-124-gyel transzfektált BHK 570 sejtekről származó kondicionált tápközeg 100 µl mennyiségét adjuk hozzá és a tenyészeteket 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután a sejteket vizuálisan vizsgáljuk a sejt megnyúlásra 30 perc után és 24 óra után. Az IL-3 nélküli BaF3 tápközeget tartalmazó negatív kontrollt és az egér TPO DNS-sel transzfektált BHK 570 sejtekről származó kondicionált tápközegű pozitív kontrollt szintén megvizsgáljuk. Az eredmények azt mutatják, hogy nincs BaF3 sejt megnyúlás a negatív kontrolban, a pozitív kontrolban





néhány sejt nyúlik meg, és a pZGmp1-124-gyel transzfektált sejtekben szignifikáns sejt megnyúlás tapasztalható.

### 15. példa

#### Receptor affinitási kicsapatás

A TPO-t termelő sejteket vagy normális BHK sejteket tartalmazó 150 mm-es szövettenyésztő lemezeket 18 órán keresztül 10 ml metionin nélküli, 2 mM L-glutamint, antibiotikumokat és 200  $\mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$ - Express (Amersham, Arlington Heights, IL) tartalmazó Dulbecco-féle MEM tápközeggel jelöljük.

Az egy éjszakás inkubálás után a fáradt tápközeget összegyűjtjük és 15 szöröserre koncentrálnak Centiprep-10 koncentrátort használva (Amicon, Inc.). A kapott koncentrátum 0,7 ml mennyiségét összekeverjük 40  $\mu\text{l}$  poli-hisztidin farkazott oldható MPL receptorral, melyet SCBr-Sepharose 4B-hez (Pharmacia) kötöttünk a gyártók útmutatásának megfelelően. A reakcióelegyet két órán keresztül jégen inkubáljuk rázatás mellett.

A sejteket egyszer PBS-sel mossuk, majd 1 ml RIP A pufferrel (10 mM Tris, pH=7,4, 1 % dezoxikolát, 1% Triton X-100, 0,1 % SDS, 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl) lizáljuk. A lizátumot centrifugáljuk az oldhatatlan anyag eltávolítása céljából és 40  $\mu\text{l}$  MPL-Sepharose-t adunk hozzá a fentiek szerint.

Ezután az MPL-Sepharose-t pelletizáljuk kis sebességű centrifugálással és a fáradt tápközeget és a sejt lizátum felülúszót eltávolítjuk. A pelletet 4-szer mossuk 0,5 M NaCl-t tartalmazó PBS-sel. Az utolsó mosás után a PBS-t eltávolítjuk és 40  $\mu\text{l}$  4 % beta-merkaptóetanolt tartalmazó 2x minta puffert (10% glicerol, 4 % SDS, 50 mM Tris, pH=7,0, 1 mM EDTA, 0,05 % brómfenol kék) adunk hozzá.

A mintákat 5 percig forraljuk és egyenként 18  $\mu\text{l}$  mennyiséget helyezünk 10-20 % gradiensű mini-gélre (Integrated Separation Systems), majd 100 V értéken

megközelítően 2 órán keresztül elektroforézisnek vetjük alá. A gélt 30 percig rögzítjük (40 % metanol, 16% vízben levő jégecet elegyében), majd 20 percre Amplify-ba (Amersham) merítjük. Szárítás után a gélt egy éjszakára filmre exponáljuk. Egy körülbelül 70 kD sáv erősen láthatóvá válik a TPO cDNS-sel transzfektált sejtekből származó fáradt tápközegnek megfelelő sávban. Ez a sáv nem szerepel a BHK sejtekről származó fáradt tápközegben vagy bármelyik sejtvonal sejtlizátumáról származó fáradt tápközegben.

A következőkből értékelni lehet, hogy bár a találmány specifikus megvalósulásait a találmány illusztrálása céljából írjuk le részletesen, különböző módosítások tehetők a találmány szellemétől és körétől való eltérés nélkül. Ennek megfelelően a találmány csupán a csatolt igénypontok szerint kerül korlátozásra.

SZEKVENCIA LISTA

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

(i) BEJELENTŐ: ZymoGenetics, Inc.

1201 Eastlake Avenue East

Seattle

WA

US

98102

BEJELENTŐ: University of Washington

Seattle

WA

US

98195

(ii) A TALÁLTMÁNY CÍME: HEMATOPOIETIKUS PROTEIN, ÉS EZEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA SZOLGÁLÓ ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

(iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 29

(iv) LEVELEZÉSI CÍM:

(A) CÍMZETT: ZymoGenetics, Inc.

(B) UTCA: 1201 Eastlake Avenue East

(C) VÁROS: Seattle

(D) ÁLLAM: WA

(E) ORSZÁG: US

(F) IRÁNYÍTÓSZÁM: 98102

(v) SZÁMÍTÓGÉPES OLVASHATÓSÁGI FORMA:

(A) A HORDOZÓ TÍPUSA: Floppy lemez

(B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC kompatibilis

(C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, #1.25 verzió

(vi) JELEN ALKALMAZÁSI ADATOK:

(A) ALKALMAZÁSI SZÁM:

(B) IKTATÁSI DÁTUM:

(C) MINŐSÍTÉS:

(viii) ÜGYVÉD/IRODA ADATOK:

(A) NÉV: Parker, Gary E

(B) REGISZTRÁCIÓS SZÁM: 31-648

(C) REFERENCIA/DOKUMENTUM SZÁM: 93-12PC

(ix) TELEKOMMUNIKÁCIÓS ADATOK:

(A) TELEFON: 206-442-6600 ext 6673

(B) TELEFAX: 206-442-6678

(2) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 1486 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: kétszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: cDNS

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: 1081

(ix) JELLEMZŐ:

(A) NÉV/KULCS: CDS

(B) LOKÁCIÓ: 105..1241



(xi) Az 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCTCGTGCCG GTCCTGAGGC CTTCTCCAC CCGGACAGAG TCCTTGGCCC ACCTCTCTCC	60
CACCCGACTC TGCCGAAAGA AGCACAGAAG CTCAAGCCGC CTCC ATG GCC CCA GGA	116
Met Ala Pro Gly	
1	
AAG ATT CAG GGG AGA GGC CCC ATA CAG GGA GCC ACT TCA GTT AGA CAC	164
Lys Ile Gln Gly Arg Gly Pro Ile Gln Gly Ala Thr Ser Val Arg His	
5 10 15 20	
CTG GCC AGA ATG GAG CTG ACT GAT TTG CTC CTG GCG GCC ATG CTT CTT	212
Leu Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu	
25 30 35	
GCA GTG GCA AGA CTA ACT CTG TCC AGC CCC GTA GCT CCT GCC TGT GAC	260
Ala Val Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys Asp	
40 45 50	
CCC AGA CTC CTA AAT AAA CTG CTG CGT GAC TCC CAC CTC CTT CAC AGC	308
Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Leu Leu His Ser	
55 60 65	
CGA CTG AGT CAG TGT CCC GAC GTC GAC CCT TTG TCT ATC CCT GTT CTG	356
Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp Pro Leu Ser Ile Pro Val Leu	
70 75 80	
CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC CTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ACG GAA	404
Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu	
85 90 95 100	
CAG AGC AAG GCA CAG GAC ATT CTA GGG GCA GTG TCC CTT CTA CTG GAG	452
Gln Ser Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu	
105 110 115	
GGA GTG ATG GCA GCA CGA GGA CAG TTG GAA CCC TCC TGC CTC TCA TCC	500
Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys Leu Ser Ser	
120 125 130	
CTC CTG GGA CAG CTT TCT GGG CAG GTT CGC CTC CTC TTG GGG GCC CTG	548
Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu	
135 140 145	
CAG GGC CTC CTA GGA ACC CAG CTT CCT CTA CAG GGC AGG ACC ACA GCT	596
Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Leu Gln Gly Arg Thr Thr Ala	
150 155 160	



CAC AAG GAC CCC AAT GCC CTC TTC TTG AGC TTG CAA CAA CTG CTT CGG His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln Gln Leu Leu Arg 165 170 175 180	644
GGA AAG GTG CGC TTC CTG CTT CTG GTA GAA GGT CCC ACC CTC TGT GTC Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro Thr Leu Cys Val 185 190 195	692
AGA CGG ACC CTG CCA ACC ACA GCT GTC CCA AGC AGT ACT TCT CAA CTC Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Ser Thr Ser Gln Leu 200 205 210	740
CTC ACA CTA AAC AAG TTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACG Leu Thr Leu Asn Lys Phe Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr 215 220 225	788
AAC TTC AGT GTC ACA GCC AGA ACT GCT GGC CCT GGA CTT CTG AGC AGG Asn Phe Ser Val Thr Ala Arg Thr Ala Gly Pro Gly Leu Leu Ser Arg 230 235 240	836
CTT CAG GGA TTC AGA GTC AAG ATT ACT CCT GGT CAG CTA AAT CAA ACC Leu Gln Gly Phe Arg Val Lys Ile Thr Pro Gly Gln Leu Asn Gln Thr 245 250 255 260	884
TCC AGG TCC CCA GTC CAA ATC TCT GGA TAC CTG AAC AGG ACA CAC GGA Ser Arg Ser Pro Val Gln Ile Ser Gly Tyr Leu Asn Arg Thr His Gly 265 270 275	932
CCT GTG AAT GGA ACT CAT GGG CTC TTT GCT GGA ACC TCA CTT CAG ACC Pro Val Asn Gly Thr His Gly Leu Phe Ala Gly Thr Ser Leu Gln Thr 280 285 290	980
CTG GAA GCC TCA GAC ATC TCG CCC GGA GCT TTC AAC AAA GGC TCC CTG Leu Glu Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala Phe Asn Lys Gly Ser Leu 295 300 305	1028
GCA TTC AAC CTC CAG GGT GGA CTT CCT CCT TCT CCA AGC CTT GCT CCT Ala Phe Asn Leu Gln Gly Gly Leu Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ala Pro 310 315 320	1076
GAT GGA CAC ACA CCC TTC CCT CCT TCA CCT GCC TTG CCC ACC ACC CAT Asp Gly His Thr Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu Pro Thr Thr His 325 330 335 340	1124
GGA TCT CCA CCC CAG CTC CAC CCC CTG TTT CCT GAC CCT TCC ACC ACC Gly Ser Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp Pro Ser Thr Thr 345 350 355	1172



ATG CCT AAC TCT ACC GCC CCT CAT CCA GTC ACA ATG TAC CCT CAT CCC 1220  
Met Pro Asn Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met Tyr Pro His Pro  
360 365 370

AGG AAT TTG TCT CAG GAA ACA TAGCGCGGGC ACTGGCCCAG TGAGCGTCTG 1271  
Arg Asn Leu Ser Gln Glu Thr  
375

CAGCTTCTCT CGGGGACAAG CTTCCCCAGG AAGGCTGAGA GGCAGCTGCA TCTGCTCCAG 1331

ATGTTCTGCT TTCACCTAAA AGGCCCTGGG GAAGGGATAC ACAGCACTGG AGATTGTAAA 1391

ATTTTAGGAG CTATTTTTTT TTAACCTATC AGCAATATTC ATCAGAGCAG CTAGCGATCT 1451

TTGGTCTATT TTCGGTATAA ATTTGAAAAT CACTA 1486

(2) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 379 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: protein

(xi) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Ala Pro Gly Lys Ile Gln Gly Arg Gly Pro Ile Gln Gly Ala Thr  
1 5 10 15

Ser Val Arg His Leu Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala  
20 25 30

Ala Met Leu Leu Ala Val Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala  
35 40 45

Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His  
50 55 60





Arg Thr His Gly Pro Val Asn Gly Thr His Gly Leu Phe Ala Gly Thr  
 275 280 285

Ser Leu Gln Thr Leu Glu Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala Phe Asn  
 290 295 300

Lys Gly Ser Leu Ala Phe Asn Leu Gln Gly Gly Leu Pro Pro Ser Pro  
 305 310 315 320

Ser Leu Ala Pro Asp Gly His Thr Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu  
 325 330 335

Pro Thr Thr His Gly Ser Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp  
 340 345 350

Pro Ser Thr Thr Met Pro Asn Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met  
 355 360 365

Tyr Pro His Pro Arg Asn Leu Ser Gln Glu Thr  
 370 375

(2) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 42 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

- (B) KLÓN: ZC5499

(xi) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CGAGCCACTT TCTGCACTCC TCGAGTTTTT TTTTTTTTTT TT

(2) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 45 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC5746

(xi) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAGAGAGAGA GAGAATTCAT GCCCTCCTGG GCCCTCTTCA TGGTC 45

(2) AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 52 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC5762

(xi) AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AGAGAGAGAG AGAGCTCGAG TCAAGGCTGC TGCCAATAGC TTAGTGGTAG GT 52

(2) A 6. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 30 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC5742

(xi) A 6. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GACCCTGGAG CTGCGCCCGC GATCTCGCTA

30

(2) A 7. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 49 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6091

(xi) A 7. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAGCACAGAA TTCACTACTC GAGGCGGCCG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 49

(2) A 8. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 45 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6603

(xi) A 8. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAGGAATTTCG CAGAAGCCAT GCCCTCTTGG GCCCTCTTCA TGGTC 45

(2) A 9. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 8 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A 9. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val Arg Thr Ser Pro Ala Gly Glu

1

5

(2) A 10. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 48 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6704

(xi) A 10. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAAGAGGAAT TCACCATGGA TGTCTTCTTG CTGGCCTTGG GCACAGAG 48

(2) A 11. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 60 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6703

(xi) A 11. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CGACTTTACC TCGAGTGCTA CTGATGCTCT TCTGCCAGCA GTCTCGGAGC CCGTGGACAC 60

(2) A 12. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 42 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6707

(xi) A 12. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AATTCGCCAT GGGACTCGAG CATCACCATC ACCATCACTG AG 42

(2) A 13. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 42 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6706

(xi) A 13. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GATCCTCAGT GATGGTGATG GTGATGCTCG AGTCCCATGG CG 42

(2) A 14. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 47 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6172

(xi) A 14. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTCGGTGCTC AGCATTCACT ACTCGAGGGT TTTTTTTTTT TTTTTT 47

(2) A 15. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 28 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6936

(xi) A 15. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AATTGGCGGC CGCGTCGACT CGTGGATG

28

(2) A 16. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 28 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC6937

(xi) A 16. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AATTCATCCA CGAGTCGACG CGGCCGCC

28

(2) A 17. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 633 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: protein

(xi) A 17. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu Leu Leu Ala

1

5

10

15

Leu Pro Asn Gln Ala Gln Val Thr Ser Gln Asp Val Phe Leu Leu Ala

20

25

30

Leu Gly Thr Glu Pro Leu Asn Cys Phe Ser Gln Thr Phe Glu Asp Leu

35 40 45

Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln

50 55 60

Leu Leu Tyr Ala Tyr Arg Gly Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Tyr

65 70 75 80

Ser Gln Ser Val Pro Thr Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro

85 90 95

Ala Gln Asp Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys

100 105 110

Asn Val Ser Leu Asn Gln Thr Leu Ile Gln Arg Val Leu Phe Val Asp

115 120 125

Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Arg Val Ile Lys Ala Arg Gly Gly

130 135 140

Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile His Trp Glu Ala Pro Ala Pro Glu

145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Leu Arg His Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Thr Asp Ser

165 170 175

Ser Asn Ala Thr Ala Pro Ser Val Ile Gln Leu Leu Ser Thr Glu Thr

180 185 190

Cys Cys Pro Thr Leu Trp Met Pro Asn Pro Val Pro Val Leu Asp Gln

195 200 205

Pro Pro Cys Val His Pro Thr Ala Ser Gln Pro His Gly Pro Val Arg

210 215 220

Thr Ser Pro Ala Gly Glu Ala Pro Phe Leu Thr Val Lys Gly Gly Ser

225 230 235 240



Cys Leu Val Ser Gly Leu Gln Ala Gly Lys Ser Tyr Trp Leu Gln Leu  
 245 250 255  
 Arg Ser Gln Pro Asp Gly Val Ser Leu Arg Gly Ser Trp Gly Pro Trp  
 260 265 270  
 Ser Phe Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Thr Ile Gly  
 275 280 285  
 Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Met Val Thr Cys Gln Trp Gln  
 290 295 300  
 Gln Gln Asp Arg Thr Ser Ser Gln Gly Phe Phe Arg His Ser Arg Thr  
 305 310 315 320  
 Arg Cys Cys Pro Thr Asp Arg Asp Pro Thr Trp Glu Lys Cys Glu Glu  
 325 330 335  
 Glu Glu Pro Arg Pro Gly Ser Gln Pro Ala Leu Val Ser Arg Cys His  
 340 345 350  
 Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Val Ile His Ile Leu Val Glu Val Thr  
 355 360 365  
 Thr Ala Gln Gly Ala Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp Ile  
 370 375 380  
 His Gln Ala Val Leu Leu Pro Thr Pro Ser Leu His Trp Arg Glu Val  
 385 390 395 400  
 Ser Ser Gly Arg Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Gln Ser Ser Trp Ala  
 405 410 415  
 Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly Arg Glu  
 420 425 430  
 Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Ser Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr Leu  
 435 440 445

Glu Leu Arg Pro Arg Ala Arg Tyr Ser Leu Gln Leu Arg Ala Arg Leu

450 455 460

Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ala Trp Ser Pro Pro Ala

465 470 475 480

Arg Val Ser Thr Gly Ser Glu Thr Ala Trp Ile Thr Leu Val Thr Ala

485 490 495

Leu Leu Leu Val Leu Ser Leu Ser Ala Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu

500 505 510

Lys Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu Trp

515 520 525

Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg Asp

530 535 540

Thr Ala Ala Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr Val Thr Asp Ser Cys Glu

545 550 555 560

Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu Ser

565 570 575

Thr Pro Leu Pro Leu Cys pro Ser Gln Pro Gln Met Asp Tyr Arg Gly

580 585 590

Leu Gln Pro Cys Leu Arg Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro Pro Met

595 600 605

Ala Glu Thr Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His Ser Tyr

610 615 620

Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

625 630

(2) A 18. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 1062 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: kétszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: cDNS

(ix) JELLEMZŐ:

(A) NÉV/KULCS: CDS

(B) LOKÁCIÓ: 1..1059

(xi) A 18. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA	48
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala	
1 5 10 15	
AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC	96
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val	
20 25 30	
CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC	144
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser	
35 40 45	
CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT	192
Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala	
50 55 60	
GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG	240
Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys	
65 70 75 80	
GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG	288
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met	
85 90 95	
GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG	336
Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly	
100 105 110	

CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu 115 120 125	384
CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp 130 135 140	432
CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val 145 150 155 160	480
CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala 165 170 175	528
CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu 180 185 190	576
AAC GAG CTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr 195 200 205	624
GCC TCA GCC AGA ACT ACT GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly 210 215 220	672
TTC AGA GCC AAG ATT CCT GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu 225 230 235 240	720
GAC CAA ATC CCC GGA TAC CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly 245 250 255	768
ACT CGT GGA CTC TTT CCT GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro 260 265 270	816
GAC ATT TCC TCA GGA ACA TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu 275 280 285	864
CAG CCT GGA TAT TCT CCT TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr 290 295 300	912



Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly  
 100 105 110  
 Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu  
 115 120 125  
 Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp  
 130 135 140  
 Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val  
 145 150 155 160  
 Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala  
 165 170 175  
 Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu  
 180 185 190  
 Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr  
 195 200 205  
 Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly  
 210 215 220  
 Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly  
 245 250 255  
 Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro  
 260 265 270  
 Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu  
 275 280 285  
 Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr  
 290 295 300  
 Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu  
 305 310 315 320  
 His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser  
 325 330 335  
 Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu  
 340 345 350  
 Gly

## (2) A 20. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

## (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 23 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

## (vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC7422

## (xi) A 20. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT

23

## (2) A 21. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

## (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 23 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

## (vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC7423

## (xi) A 21. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AGCCTCCTTG GTACCCAGCT TCC

23

## (2) A 22. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

## (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 20 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC7424

(xi) A 22. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTAGACACCT GGCCAGAATG

20

(2) A 23. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 24 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC7421

(xi) A 23. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TGATGTCGGC AGTGTCTGAG AACC

24

(2) A 24. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 29 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC7454



(xi) A 24. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCGGAATTCT TAGACACCTG GCCAGAATG

29

(2) A 25. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 33 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC7453

(xi) A 25. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCGGAATTCT GATGTCGGCA GTGTCTGAGA ACC

33

(2) A 26. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 33 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC7318

(xi) A 26. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TACCGAATTC TAGACACAGA GGGTGGGACC TTC

33

## (2) A 27. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

## (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 30 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

## (vii) EREDETI FORRÁS:

(B) KLÓN: ZC7319

## (xi) A 27. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ACACTGAATT CTTCTCCACC CGGACAGAGT

30

## (2) A 28. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

## (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 4823 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTÍPUS: kétszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

## (ii) A MOLEKULA TÍPUSA: DNS (genom)

## (ix) JELLEMZŐ:

(A) NÉV/KULCS: CDS

(B) LOKÁCIÓ: csatlakozás(632..644, 876..1003,

1290..1376, 3309..3476, 3713..4375)

(xi) A 28. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTTCTTGCT TTCTTTCTTT CTTTCTTCT TTCTTTTTTT TTTTGAGAC GGAGTTTCAC	60
TCTTATTGCC CAGGCTGGAG TGCAATGGTG CGATCTCGGC TCACCACAAC CTCCGCCTCC	120
CAGGTACAAG CGATTCTCCT GTCTCAGCCT CCCAAGTAGC TTGGATTACA GGCATGAACC	180
ACCACACCCT GCTAGTTTTT TTGTATTTTC TAGAGCCGGG GTTTCACCAT GTTAGTGAGG	240
CTGGTGGCGA ACTCCTGACC TCAGGTGATC CACCCGCCTT GGA CTCCCAA AGTGCTGGGA	300
TTACAGGCAT GAGCCACTGC ACCCGGCACA CCATATGCTT TCATCACAAG AAAATGTGAG	360
AGAATTCAGG GCTTTGGCAG TTCCAGGCTG GTCAGCATCT CAAGCCCTCC CCAGCATCTG	420
TTCACCCTGC CAGGCAGTCT CTTCTAGAA ACTTGTTAA ATGTTCACTC TTCTTGCTAC	480
TTTCAGGATA GATTCTTCAC CCTTGGTCCG CCTTTGCCCC ACCCTACTCT GCCCAGAAGT	540
GCAAGAGCCT AAGCCGCCTC CATGGCCCCA GGAAGGATTC AGGGGAGAGG CCCCAAACAG	600
GGAGCCACGC CAGCCAGACA CCCC GGCCAG A ATG GAG CTG ACT G GTGAGAACAC	654
Met Glu Leu Thr	
1	
ACCTGAGGGG CTAGGGCCAT ATGGAACAT GACAGAAGGG GAGAGAGAAA GGAGACACGC	714
TGCAGGGGGC AGGAAGCTGG GGAACCCAT TCTCCAAAA ATAAGGGGTC TGAGGGGTGG	774
ATTCCCTGGG TTTCAGGTCT GGGTCCTGAA TGGGAATTCC TGAATACCA GCTGACAATG	834
ATTCCTCCT CATCTTTCAA CCTCACCTCT CCTCATCTAA G AA TTG CTC CTC	886
Glu Leu Leu Leu	
5	
GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT	934
Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala	
10 15 20	
CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC	982
Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser	
25 30 35 40	

CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG GTGAGAACTC CCAACATTAT CCCCTTTATC His Val Leu His Ser Arg Leu 45	1033
CGCGTAACTG GTAAGACACC CATACTCCCA GGAAGACACC ATCACTTCCT CTAACCTCCT	1093
GACCCAATGA CTATTCTTCC CATATTGTCC CCACCTACTG ATCACACTCT CTGACAAGGA	1153
TTATTCTTCA CAATACAGCC CGCATTTAAA AGCTCTCGTC TAGAGATAGT ACTCATGGAG	1213
GACTAGCCTG CTTATTAGGC TACCATAGCT CTCTCTATTT CAGCTCCCTT CTCCCCCAC	1273
CAATCTTTTT CAACAG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr 50 55	1322
CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr 60 65 70	1370
CAG ATG GTAAGAAAGC CATCCCTAAC CTTGGCTTCC CTAAGTCCTG TCTTCAGTTT Gln Met 75	1426
CCCCTGCTT CCCATGGATT CTCCAACATT CTTGAGCTTT TAAAAAATAT CTCACCTTCA	1486
GCTTGGCCAC CCTAACCCAA TCTACATTCA CCTATGATGA TAGCCTGTGG ATAAGATGAT	1546
GGCTTGCAGG TCCAATATGT GAATAGATTT GAAGCTGAAC ACCATGAAAA GCTGGAGAGA	1606
AATCGCTCAT GGCCATGCCT TTGACCTATT CCCGTTTCAGT CTTCTTAAAT TGGCATGAAG	1666
AAGCAAGACT CATATGTCAT CCACAGATGA CACAAAGCTG GGAAGTACCA CTAAAATAAC	1726
AAAAGACTGA ATCAAGATTC AAATCACTGA AAGACTAGGT CAAAAACAAG GTGAAACAAC	1786
AGAGATATAA ACTTCTACAT GTGGGCCGGG GGCTCACGCC TGTAATCCCA GCACTTTGGG	1846
AGGCCGAGGC AGGCAGATCA CCTGAGGGCA GGAGTTTGAG AGCAGCCTGG CCAACATGGC	1906
GAAACCCCGT CTCTACTAAG AATACAGAAT TAGCCGGGCA TGGTAGTGCA TGCCTGTAAT	1966
CCCAGCTACT TGGAAGGCTG AAGCAGGAGA ATCCCTTGAA CCCAGGAGGT GGAGGTTGTA	2026
GTGAGCTGAG ATCATGCCAA TGCACTCCAG CCTGGGTGAC AAGAGCAAAA CTCCGTCTCA	2086



AAAAGAAAA AAAATTCTAC ATGTGTAAT TAATGAGTAA AGTCCTATTC CAGCTTTCAG 2146  
GCCACAATGC CCTGCTTCCA TCATTTAAGC CTCTGGCCCT AGCACTTCTT ACGAAAAGGA 2206  
TCTGAGAGAA TTAAATTGCC CCCAACTTA CCATGTAACA TTAAGTGAAGC TGCTATTCTT 2266  
AAAGCTAGTA ATTCTTGTCT GTTTGATGTT TAGCATCCCC ATTGTGGAAA TGCTCGTACA 2326  
GAACTCTATT CCGAGTGGAC TACACTTAAA TATACTGGCC TGAACACCGG ACATCCCCCT 2386  
GAAGACATAT GCTAATTTAT TAAGAGGGAC CATATTAAC TAACATGTGT CTAGAAAGCA 2446  
GCAGCCTGAA CAGAAAGAGA CTAGAAGCAT GTTTTATGGG CAATAGTTTA AAAAATAAA 2506  
ATCTATCTC AAGAACCCTA GCGTCCCTC TTCCTCAGG ACTGAGTCAG GGAAGAAGGG 2566  
CAGTTCCTAT GGGTCCCTC TAGTCCTTC TTTTCATCCT TATGATCATT ATGGTAGAGT 2626  
CTCATACCTA CATTTAGTTT ATTTATTATT ATTATTTGAG ACGGAGTCTC ACTCTATCCC 2686  
CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ATGATCTCAA CTCACTGCAA CCTCAGCCTC CCGGATTCAA 2746  
GCGATTCTCC TGTCTCAGTC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC AGGTGCCAC CACCATGCCC 2806  
AGCTAATTTG TGTATTTGTG GTAGAGATGG GGTTCACCA TGTTGGGCAG GCTGATCTTG 2866  
AACTCCTGAC CTCAGGTGAT CCACCTGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG 2926  
TGAGCCACTG CACCCAGCCT TCATTCAGTT TAAAAATCAA ATGATCCTAA GGTTTTGCAG 2986  
CAGAAAGAGT AAATTTGCAG CACTAGAACC AAGAGGTAAG AGCTGTAACA GGGCAGATTT 3046  
CAGCAACGTA AGAAAAAAGG AGCTCTTCTC ACTGAAACCA AGTGTAAAGAC CAGGCTGGAC 3106  
TAGAGGACAC GGGAGTTTTT GAAGCAGAGG CTGATGACCA GCTGTGGGA GACTGTGAAG 3166  
GAATTCCTGC CCTGGGTGGG ACCTTGGTCC TGTCCAGTTC TCAGCCTGTA TGATTCCTC 3226  
TGCTGGCTAC TCCTAAGGCT CCCACCCGC TTTTAGTGTG CCCTTTGAGG CAGTGCGCTT 3286  
CTCTCTTCCA TCTCTTCTC AG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA 3338  
Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly

GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG 3386  
 Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu  
                   90                                  95                                  100

GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC 3434  
 Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val  
                   105                                  110                                  115

CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG 3476  
 Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln  
                   120                                  125                                  130

GTAAGTCCCC AGTCAAGGGA TCTGTAGAAA CTGTTCTTTT CTGACTCAGT CCCCTAGAA 3536

GACCTGAGGG AAGAAGGGCT CTTCCAGGGA GCTCAAGGGC AGAAGAGCTG ATCTACTAAG 3596

AGTGCTCCCT GCCAGCCACA ATGCCTGGGT ACTGGCATCC TGTCTTTCCT ACTTAGACAA 3656

GGGAGGCCTG AGATCTGGCC CTGGTGTTTG GCCTCAGGAC CATCCTCTGC CCTCAG 3712

CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC 3760  
 Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile  
                   135                                  140                                  145

TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG 3808  
 Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met  
                   150                                  155                                  160

CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA 3856  
 Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr  
                   165                                  170                                  175                                  180

GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA 3904  
 Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro  
                                   185                                  190                                  195

AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA 3952  
 Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg  
                                   200                                  205                                  210

ACT ACT GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GCC AAG 4000  
 Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys  
                   215                                  220                                  225

ATT CCT GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro 230 235 240	4048
GGA TAC CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA ACT CGT GGA CTC Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu 245 250 255 260	4096
TTT CCT GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser 265 270 275	4144
GGA ACA TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr 280 285 290	4192
TCT CCT TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro 295 300 305	4240
CTT CCA CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu 310 315 320	4288
CCT GAC CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn 325 330 335 340	4336
ACA TCC TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAAGGTTCTC Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly 345 350	4385
AGACACTGCC GACATCAGCA TTGTCTCGTG TACAGCTCCC TTCCCTGCAG GGCGCCCTG	4445
GGAGACA ACT GGACAAGATT TCCTACTTTC TCCTGAAACC CAAAGCCCTG GTAAAAGGGA	4505
TACACAGGAC TGAAAAGGGA ATCATT TTTTC ACTGTACATT ATAAACCTTC AGAAGCTATT	4565
TTTTTAAGCT ATCAGCAATA CTCATCAGAG CAGCTAGCTC TTTGGTCTAT TTTCTGCAGA	4625
AATTTGCAAC TCACTGATTC TCAACATGCT CTTTTTCTGT GATAACTCTG CAAAGACCTG	4685
GGCTGGCCTG GCAGTTGAAC AGAGGGAGAG ACTAACCTTG AGTCAGAAAA CAGAGGAAGG	4745
GTAATTTCTTCT TTGCTTCAAA TTCAAGGCCT TCCAACGCC CCATCCCCTT TACTATCATT	4805
CTCAGTGGGA CTCTGATC	4823

(2) A 29. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 353 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: protein

(xi) A 29. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val  
                   20                    25                    30  
 Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser  
                   35                    40                    45  
 Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala  
                   50                    55                    60  
 Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys  
 65                    70                    75                    80  
 Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met  
                   85                    90                    95  
 Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly  
                   100                    105                    110  
 Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu  
                   115                    120                    125  
 Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp  
                   130                    135                    140



Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val

145                    150                    155                    160

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala

165                    170                    175

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu

180                    185                    190

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr

195                    200                    205

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly

210                    215                    220

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu

225                    230                    235                    240

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly

245                    250                    255

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro

260                    265                    270

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu

275                    280                    285

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr

290                    295                    300

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu

305                    310                    315                    320

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser

325                    330                    335

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu

340                    345                    350

Gly

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy izolált protein, azzal jellemezve, hogy az alábbiakat magába foglaló csoportból szelektáljuk:

a) a 2. számú szekvencia aminosavjainak szekvenciáját tartalmazó proteineket a 45 aminosavmaradéktól a 196 aminosavmaradékig;

b) a 2. számú szekvencia aminosavjainak szekvenciáját tartalmazó proteineket a 45 aminosavmaradéktól a 206 aminosavmaradékig;

c) a 19. számú szekvencia aminosavjainak szekvenciáját tartalmazó proteineket a 22 aminosavmaradéktól a 173 aminosavmaradékig;

d) a 19. számú szekvencia aminosavjainak szekvenciáját tartalmazó proteineket a 22 aminosavmaradéktól a 175 aminosavmaradékig;

e) az (a), (b), (c) vagy a (d) allelikus variánsait; és

f) az (a), (b), (c), (d) vagy az (e) faj homológokat, ahol az említett protein a mieloid vagy limfoid prekursorok szaporodását vagy differenciálódását stimulálják.

2. Az 1. igénypont szerinti izolált protein, azzal jellemezve, hogy az említett protein a 2. számú szekvencia aminosavjainak szekvenciáját tartalmazza a 45 aminosavmaradéktól a 379 aminosavmaradékig.

3. Az 1. igénypont szerinti izolált protein, azzal jellemezve, hogy az említett protein a 2. számú szekvencia aminosavjainak szekvenciáját tartalmazza a 22 aminosavmaradéktól a 353 aminosavmaradékig.

4. Az 1. igénypont szerinti izolált protein, azzal jellemezve, hogy az említett protein egy egér proteint jelent.

5. Az 1. igénypont szerinti izolált protein, azzal jellemezve, hogy az említett protein egy humán proteint jelent.

6. Az 1. igénypont szerinti izolált protein, azzal jellemezve, hogy az említett protein

a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából a 45-379 aminosav maradékokat;

a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából a 24-196 aminosav maradékokat;

a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából a 24-206 aminosav maradékokat;

a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából a 24-379 aminosav maradékokat;

a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából az 1-196 aminosav maradékokat;

a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából az 1-206 aminosav maradékokat; vagy

a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából az 1-379 aminosav maradékokat tartalmazza.

7. Az 1. igénypont szerinti izolált protein, azzal jellemezve, hogy az említett protein

a 19. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából az 1-173 aminosav maradékokat;

a 19. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából az 1-175 aminosav maradékokat;

a 19. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából az 1-353 aminosav maradékokat; vagy

a 19. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciájából a 22-353 aminosav maradékokat tartalmazza.

8. Egy izolált protein, azzal jellemezve, hogy alapjában véve
- a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciából a 45-196 aminosav maradékokat;
  - a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciából a 45-206 aminosav maradékokat;
  - a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciából a 45-379 aminosav maradékokat;
  - a 19. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciából az 22-175 aminosav maradékokat; és
  - a 19. számú szekvenciában bemutatott aminosavak szekvenciából a 22-353 aminosav maradékokat magába foglaló csoportból szelektált aminosavak szekvenciáját tartalmazza.
9. Egy a mieloid vagy limfoid prekursorok szaporodását vagy differenciálódását stimuláló izolált protein azzal jellemezve, hogy az említett protein magába foglal egy olyan szegmentet, mely aminosav szinten a 2. számú szekvencia aminosavainak szekvenciájában a 45-196 aminosav maradékokkal, vagy a 19. számú szekvencia aminosavainak szekvenciájában a 22-173 aminosav maradékokkal legalább 80 %-os azonosságot mutat.
10. Egy izolált polinukleotid molekula, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti proteint kódolja.
11. A 10. igénypont szerinti izolált polinukleotid molekula, azzal jellemezve, hogy az említett molekula egy olyan DNS molekula, mely az 1. számú szekvencia 237-692 nukleotidjait tartalmazó kódoló szálát tartalmaz.

12. A 10. igénypont szerinti izolált polinukleotid molekula, azzal jellemezve, hogy az említett molekula egy olyan DNS molekula, mely a 18. számú szekvencia 64-519 nukleotidjait tartalmazó kódoló szálát tartalmaz.

13. A 10. igénypont szerinti izolált polinukleotid molekula, azzal jellemezve, hogy az említett molekula a 2. számú szekvencia aminosav szekvenciájában levő a 45-196 aminosav maradékokat kódolja.

14. A 10. igénypont szerinti izolált polinukleotid molekula, azzal jellemezve, hogy az említett molekula a 19. számú szekvencia aminosav szekvenciájában levő a 22-173 aminosav maradékokat kódolja.

15. Egy izolált polinukleotid molekula, azzal jellemezve, hogy

(a) egy hematopoietikus proteint kódoló, valamint az 1. számú szekvenciában bemutatott a 237-692 nukleotidokat tartalmazó DNS molekulákat;

(b) egy hematopoietikus proteint kódoló, valamint a 18. számú szekvenciában bemutatott, a 64-519 nukleotidokat tartalmazó DNS molekulákat;

(c) az (a) vagy (b) allelikus variánsait;

(d) az (a), (b) vagy (c) pontokban szereplő DNS molekulák által kódolt proteinnel aminosav szinten legalább 80 %-os azonosságot mutató hematopoietikus proteint kódoló DNS molekulákat; és

az (a), (b), (c) vagy (d) pontokban szereplő molekulákkal komplementer molekulákat magába foglaló csoportból szelektáljuk.

16. A 15. igénypont szerinti izolált polinukleotid molekula, azzal jellemezve, hogy az említett molekula az (a), (b) vagy a (c) pontokban szereplő DNS molekulák által kódolt proteinekkel aminosav szinten legalább 90 %-os azonosságot mutató hematopoietikus proteint kódol.

17. A 15. igénypont szerinti izolált polinukleotid molekula, azzal jellemezve, hogy az 1. számú szekvencia 237-722 nukleotidjait vagy a 18. számú szekvencia 1-64 nukleotidjait tartalmazza.

18. Egy izolált DNS molekula, azzal jellemezve, hogy

(a) a pZGmp1-1081 plazmid Eco RI-Xho I inzertjét (ATCC 69566);

(b) az (a) allelikus variánsait; és

(c) az (a) vagy a (b) által kódolt proteinnel aminosav szinten legalább 80 %-os azonosságot mutató proteint kódoló DNS molekulákat tartalmaz, ahol az említett izolált DNS molekula hematopietikus aktivitással rendelkező proteint kódol.

19. Egy a 18. igénypont szerinti izolált DNS molekula, azzal jellemezve, hogy az említett molekula a 2. számú szekvencia 45-196 aminosav maradékait magába foglaló aminosav szekvenciáját tartalmazó polipeptidet kódolja.

20. Egy expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy

egy transzkripció promótert;

egy az alábbi csoportból szelektált DNS szegmentet:

a) egy hematopietikus proteint kódoló, valamint az 1. számú szekvenciában bemutatott a 237-692 nukleotidokat magába foglaló nukleotid szekvenciát tartalmazó DNS szegmenteket;

b) egy hematopietikus proteint kódoló, valamint az 18. számú szekvenciában bemutatott a 64-519 nukleotidokat magába foglaló nukleotid szekvenciát tartalmazó DNS szegmenteket;

c) az a) és b) allelikus variánsait; és

d) egy az a), b) vagy c) által kódolt proteinnel aminosav szinten legalább 80 %-os azonosságot mutató hematopietikus proteint kódoló DNS szegmentet;

valamint egy transzkripció terminátort működőképesen összekapcsolva tartalmaz.

21. A 20. igénypont szerinti expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy az említett DNS szegment egy olyan hematopoietikus proteint kódol, mely az a), b) vagy c) által kódolt proteinnel aminosav szinten legalább 90 %-os azonosságot mutat.

22. Egy a 20. igénypont szerinti expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy az említett DNS szegment az 1. számú szekvencia 237-525 nukleotidjait vagy a 18. számú szekvencia 64-525 nukleotidjait tartalmazza.

23. Egy a 20. igénypont szerinti expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a DNS szegmenthez működőképesen kapcsolódva egy szekréción jel szekvenciát tartalmaz.

24. Egy a 20. igénypont szerinti expressziós vektorral rendelkező tenyésztett sejt, azzal jellemezve, hogy az említett sejt a DNS szegment által kódolt hematopoietikus proteint expresszálja.

25. A 24. igénypont szerinti tenyésztett sejt, azzal jellemezve, hogy az említett sejt egy fonalagomba sejtet jelent.

26. A 24. igénypont szerinti tenyésztett sejt, azzal jellemezve, hogy az említett sejt egy élesztőgomba sejtet jelent.

27. A 24. igénypont szerinti tenyésztett sejt, azzal jellemezve, hogy az említett sejt egy emlős sejtet jelent.

28. A 24. igénypont szerinti tenyésztett sejt, azzal jellemezve, hogy az említett sejt egy baktérium sejtet jelent.

29. Egy nem-humán emlős, azzal jellemezve, hogy genetikai vonalába egy az alábbi csoportból szelektált heterológ DNS szegmentet juttatunk be:

(a) egy hematopoiitikus proteint kódoló, valamint az 1. számú szekvenciában bemutatott 237-692 nukleotidokat magába foglaló nukleotid szekvenciát tartalmazó DNS szegmentek;

(b) egy hematopoiitikus proteint kódoló, valamint az 18. számú szekvenciában bemutatott 64-519 nukleotidokat magába foglaló nukleotid szekvenciát tartalmazó DNS szegmentek;

(c) az (a) és (b) allelikus variánsai;

(d) az (a), (b) vagy (c) által kódolt proteinnel aminosav szinten legalább 80%-os azonosságot mutató hematopoiitikus proteint kódoló DNS szegmentek;

ahol az említett emlős az említett DNS által kódolt hematopoiitikus proteint termeli.

30. Egy a 29. igénypont szerinti nem-humán emlős, azzal jellemezve, hogy a sertést, kecskét, birkát, szarvasmarhát és egeret magába foglaló csoporttól szelektáljuk.

31. Egy a 29. igénypont szerinti nem-humán emlős, azzal jellemezve, hogy az említett DNS szegment az 1. számú szekvencia 237-722 nukleotidjait vagy a 18. számú szekvencia 64-525 nukleotidjait tartalmazza.

32. Egy hematopoiitikus protein termelésére szolgáló módszer, azzal jellemezve, hogy:

egy a 20. igénypont szerinti expressziós vektort tartalmazó sejtet tenyésztünk, mely említett sejt a DNS szegment által kódolt hematopoiitikus proteint expresszálja; és

a hematopoiitikus proteint kinyerjük.

33. A 32. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az említett hematopoiitikus proteint az említett sejt termeli és abból a tápközegből nyerjük ki, melyben az említett sejtet tenyésztjük.



34. Egy gyógyszerészeti készítmény, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti proteint egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval együtt tartalmaz.

35. Egy antitest, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti protein egy epitópjához kötődik.

36. Egy emlősben való vérlemezke termelés stimulálására szolgáló módszer, azzal jellemezve, hogy az említett emlősnek az alábbi csoportokból szelektált hematopoietikus protein egy gyógyszerészetileg hatékony mennyiségét adjuk:

a) a 2. számú aminosav szekvencia 45-196 maradékait tartalmazó szekvenciát magába foglaló proteineket;

b) a 19. számú aminosav szekvencia 22-173 maradékait tartalmazó szekvenciát magába foglaló proteineket;

c) az (a) vagy (b) allelikus variánsait; és

d) az (a), b(b) vagy (c) típus homológjait;

ahol az említett protein, együtt egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval a mieloid vagy limfoid prekursorok differenciálódását vagy szaporodását stimulálja.

37. Egy legalább 14 nukleotidból álló oligonukleotidot tartalmazó próba, azzal jellemezve, hogy az említett oligonukleotid szekvenciája az

(a) 1. számú szekvencia

(b) 18. számú szekvencia

(c) 28. számú szekvencia; vagy

(d) az 1. számú szekvenciával, a 18. számú szekvenciával vagy a 28. számú szekvenciával komplementer szekvenciák

azonos hosszúságú részeivel legalább 80 %-os azonosságot mutat.

38. Egy DNS molekulák elegendőben egy thrombopoietint kódoló DNS detektálására szolgáló módszer, azzal jellemezve, hogy DNS molekulák egy

keverékét próbáltatjuk egy legalább 14 nukleotidból álló oligonukleotidot tartalmazó próbával, ahol az említett oligonukleotid szekvenciája az

- (a) 1. számú szekvencia
- (b) 18. számú szekvencia
- (c) 28. számú szekvencia; vagy
- (d) az 1. számú szekvenciával, a 18. számú szekvenciával vagy a 28. számú

szekvenciával komplementer szekvenciák

azonos hosszúságú részeivel legalább 80 %-os azonosságot mutat; és

azokat a DNS molekulákat, melyekhez az említett próba hibridizálódik, detektáljuk.

39. A sejt szaporodás stimulálására szolgáló módszer, azzal jellemezve, hogy a tenyésztett csontvelő sejtekhez az 1. igénypont szerinti proteint a sejtek szaporodásának stimulálására elegendő mennyiségben adjuk.

40. A 39. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az említett sejtek megakariocitákat vagy megakariocita prekursorokat jelentenek.

41. Egy a thrombopoietin tisztítására szolgáló módszer, azzal jellemezve, hogy

a thrombopoietint tartalmazó oldatot egy szilárd támasztékhoz kötött antitest hatásának vetjük alá, ahol az említett antitest az 1. igénypont szerinti protein egy epitópjához kötődik;

az említett antitestet mossuk a nem kötött szennyeződések eltávolítása céljából;

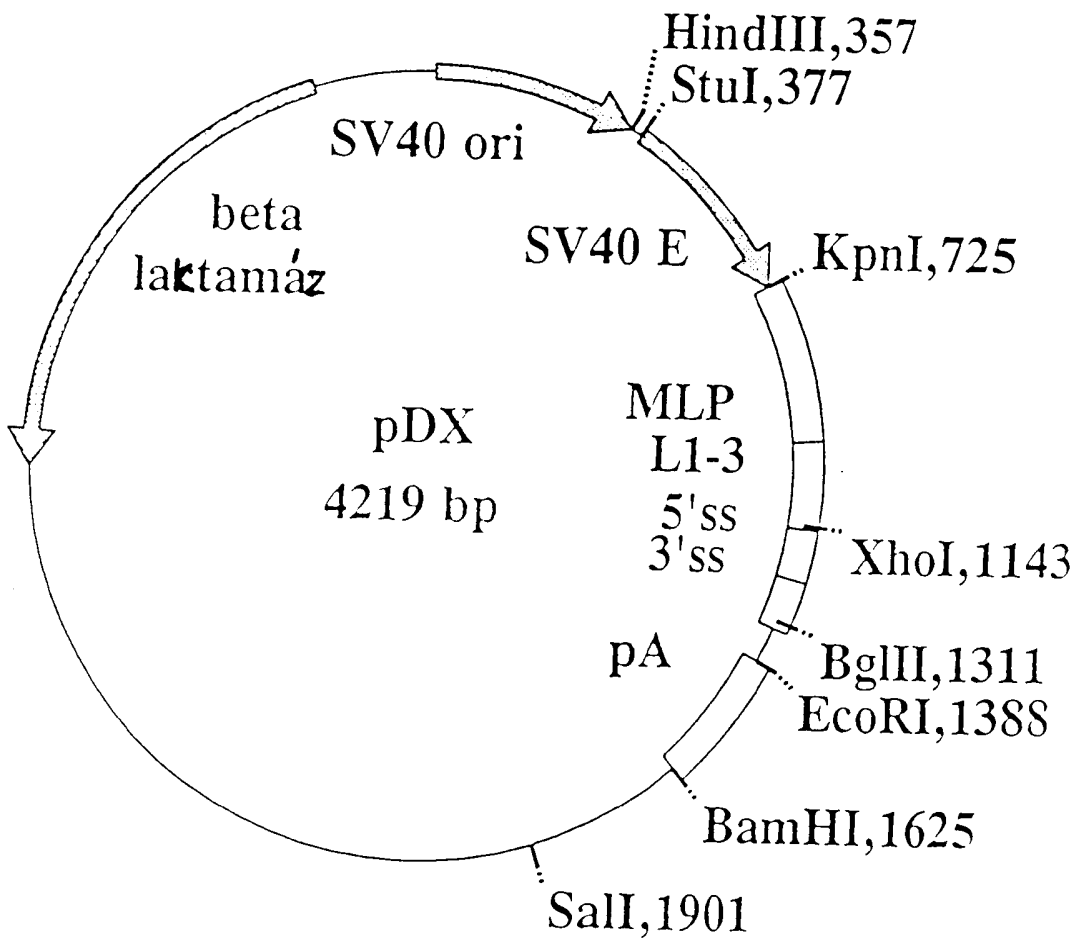
az említett antitestről a kötött thrombopoietint eluáljuk; és

az eluált thrombopoietint kinyerjük.

137 oldal  
+ 2 oldal oldal  
139 oldal  
További

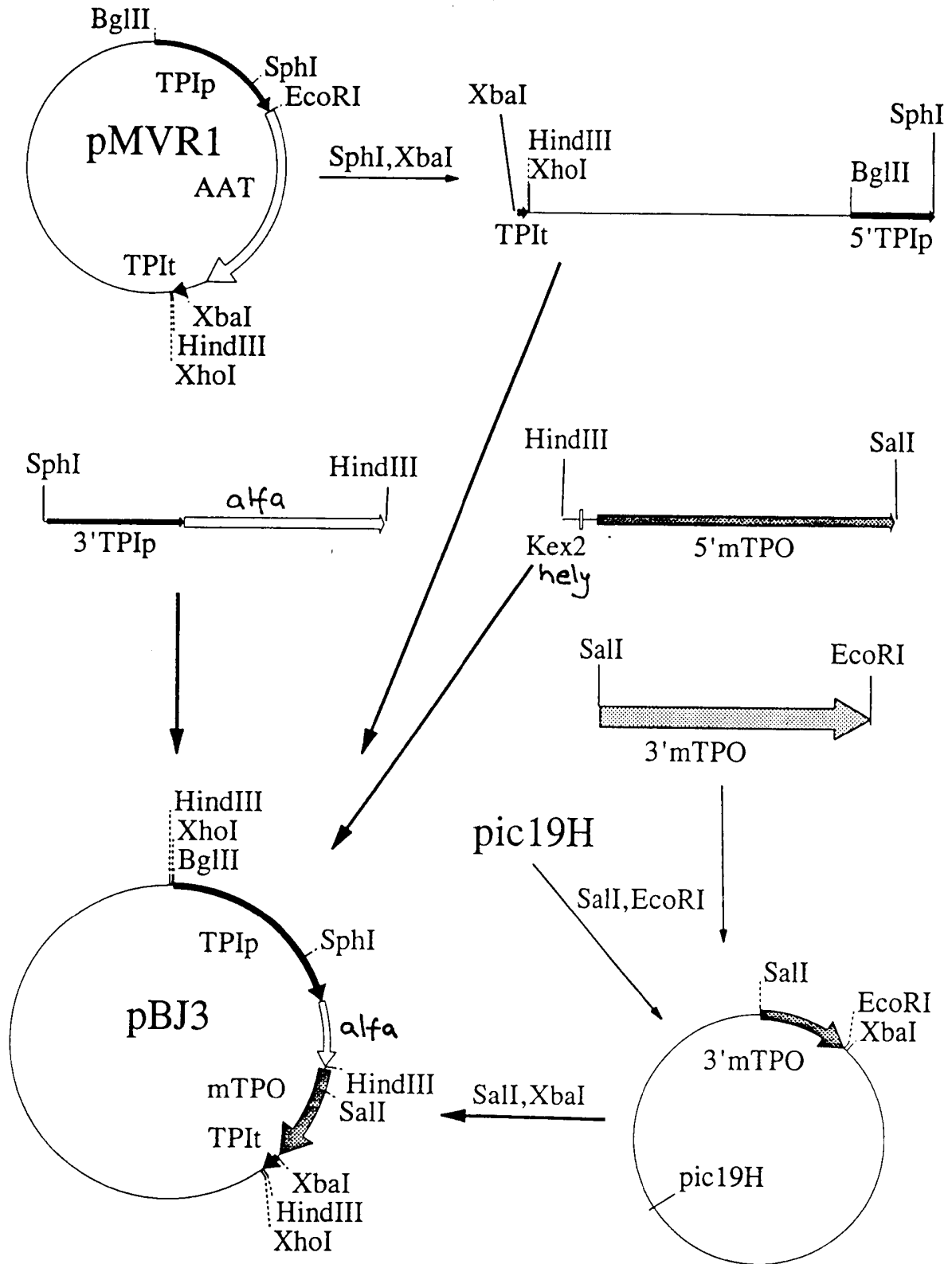
A meghatalmazott

**ifj. Szentpéteri Ádám**  
szabadalmi ügyvivő  
S.H.G. & K. Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1067 Budapest, Andrássy út 114.



1. ábra

2. ábra



ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
Tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323