



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

218 411 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 93 02059

(22) A bejelentés napja: 1993. 07. 16.

(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.

(30) Elsőbbségi adatok:

4-212 305/92 1992. 07. 17. JP

5-067 339/93 1993. 03. 04. JP

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/12

C 12 N 15/86

C 12 N 7/00

C 12 P 21/00

C 12 P 21/08

A 61 K 38/18

(40) A közzététel napja: 1995. 02. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 08. 28.

(72) Feltalálók:

Ishida, Nobuhiro, Osaka (JP)

Iwasa, Fuyuki, Osaka (JP)

Kurihara, Tatsuya, Osaka (JP)

Miura, Kenjo, Osaka (JP)

Nakazato, Hiroshi, Osaka (JP)

Tsujimoto, Masafumi, Osaka (JP)

Tsuruoka, Nobuo, Osaka (JP)

Yamaguchi, Nozomi, Kyoto (JP)

Yamaichi, Kozo, Osaka (JP)

(73) Szabadalmaz:

Suntory Ltd., Osaka (JP)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Megakariocita érési faktor

KIVONAT

A találmány tárgyát új megakariocita érési faktor képezi. A találmány tárgyát képezi továbbá a megakariocita érési faktort kódoló DNS; az említett DNS-t tartalmazó expressziós vektor; az említett expressziós vektorral transzformált gazdasejt; egy eljárás a gazdasejtek felhasználásával megakariocita érési faktor előállítására.

A találmány szerinti megakariocita érési faktor IL-3 jelenlétében stimulálja a megakariociták érését és trombopoietinként hat, ezáltal hatásos gyógyászati készítmény különböző vérlemezkeszám-csökkenéssel járó megbetegedések kezelésére.

HU 218 411 B

A találmány tárgyát megakariocita érési faktor, a faktort kódoló gén, valamint annak előállítására szolgáló eljárás képezi. A megakariocita érési faktor alkalmazható vérképzést stimuláló faktorként a megakariocita-vérlemezké vonalban.

Ismeretes, hogy a vérképzésben szereplő őssejtek érett vörsejtek alakulása során a vörsejtek növekedését és érését megindító, különböző vérképzést elősegítő faktorok játszanak szerepet.

Bár a vérlemezkék élettartama mindössze 9–10 nap, nyugalmi állapotban a vérlemezkék koncentrációja a vérben meglehetősen állandó szinten marad. Emellett, ha a rendelkezésre álló módszerek egyikével a vérlemezkék számát kísérleti állatban mesterségesen csökkentjük, a vérlemezkék száma a vérben néhány napon belül helyreáll. Ezen adatok alapján feltételezték a vérlemezkék termelődését elősegítő faktorok jelenlétét, és komoly erőfeszítéseket tettek a faktorok azonosítására.

Feltevésük szerint legalább két szabályozófaktor vesz részt a megakariocita-vérlemezké vérképzési vonalban. Az első faktor önmagában megakariocita kolóniák képződését segíti elő és megakariocitakolónia-stimuláló faktornak nevezik. A második faktor önmagában nem rendelkezik megakariocitakolónia-kialakulást elősegítő aktivitással, azonban az első faktortal együtt megnöveli a képződő megakariocita kolóniák számát, és stimulálja ezek érését, ezt a faktort megakariocita-potenciáló faktornak nevezzük.

Az előző az interleukin 3-at, valamint a granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktort foglalja magában, az utóbbi az eritropoetint, a makrofágkolónia-stimuláló faktort, az interleukin 6-ot, 7-et és 11-et, a LIF-et és hasonlókat foglal magában. Ezek közül a faktorok közül néhány in vivo körülmények között növeli a vérlemezkék számát vagy lerövidíti a vérlemezkék számának helyreállításához szükséges időt [Hideaki Mizoguchi, Tanpakushitsu Kakusan Koso, 36, 1195, (1991), japánul].

Ezen faktorok többsége azonban a különböző vérképző vonalak vörsejtjeinek érésében, ezen belül a megakariocita-vérlemezké vonal sejtjeinek érésében betöltött szerepén felül változatos biológiai hatást fejt ki. Az IL-6 és az IL-11 például in vivo trombopoetikus hatást fejtenek ki, ezenkívül stimulálják az akut fázis proteintermelődését, és súlyos esetekben kachexiát okoznak. Ezenkívül az IL-6 különböző klinikai problémákat kísérhet; például lehetséges, hogy az IL-6 stimulálja a mezangiumsejtek szaporodását a vesében, így veseelégtelenséget okoz [Tadashi Matsuda és munkatársai, Tanpakushitsu Kakusan Koso, 36, 1184, (1991), japánul]. Mivel az IL-6 a trombocitopénias fázisban nem ér el magas szintet a vérben, nem tekintik fiziológiás faktornak.

A vérlemezkék fontos szerepet játszanak a hemosztázisban. A vérlemezkék számának csökkenésével járó megbetegedések (Falconi-szindróma, megakariocitás trombocitopénia, aplasztikus anémia és hasonlóak) klinikailag veszélyesek, különösen a vérzékenység ellenőrizhetetlen. Feltételezhető, hogy egy, a vérlemezkék termelődését stimuláló faktor izolálása és azonosítása hasznos lehet a fent említett veszély megelőzésére.

Napjainkban a csontvelő-átültetés a leukémiák stb. kezelésének hatásos eszközévé vált, és a citokinek, például eritropoetin (EPO), granulocitakolónia-stimuláló faktor (GCSF) stb. alkalmazásával növekszik a sikeres esetek aránya. A csontvelő-átültetéseknel jelenleg a problémát a vérlemezkék számának csökkenése jelenti, és amennyiben egy trombopoetikus faktor rendelkezésre állna, a sikeres esetek száma várhatóan növekedne, és a kórházi kezelés ideje megrövidülne. Nemcsak a vérképző rendszeri betegségek, hanem a daganatos betegségek kemoterápiája és radioizotópterápiája során kialakuló trombocitopénia is kézben tartható lehet trombopoetinnel.

Az ismert faktorokkal kapcsolatos fent említett nehézségeket figyelembe véve különböző kutatásokat végeztünk egy vérlemezkék termelődését stimuláló és trombocitopéniával vagy elégtelen vérlemezké-funkcióval rendelkező betegek kezelésében hatásos faktor izolálása céljából, és ennek eredményeképpen egy új, megakariociták érését stimuláló faktort találtunk, az említett faktort kódoló gént klónoztuk, előállítottunk egy expressziós vektort, és sikerült az említett faktor előállítása céljából a gént expresszálnunk.

A találmány tárgyát megakariocita érési faktor képezi, amely a következő sajátságokkal rendelkezik;

- (1) stimulálja a megakariociták érését;
- (2) 55–57 kilodalton (kD) közötti molekulatömeggel rendelkezik gélzsűrűséssel és SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) vizsgálva és nem található benne molekulán belüli diszulfidkötés;
- (3) izoelektromos pontja $6,5 \pm 0,5$; és
- (4) a szekvencialista szerinti 1–9. szekvenciák legalább egyikének megfelelő aminosavszekvenciával rendelkezik.

A találmány tárgya kiterjed a megakariocita érési faktort kódoló génre is.

A találmány tárgykörébe tartozik továbbá egy, a megakariocita érési faktort kódoló gént tartalmazó expressziós vektor.

A találmány tárgyát képezi ezenkívül egy, az expressziós vektorral transzformált gazdasejt.

A találmány kiterjed az említett gazdasejt felhasználásával a megakariocita érési faktor előállítására szolgáló eljárásra.

A mellékelt 1. ábra egy Q-Sepharose oszlopról nyert protein (A 280 -.-) és megakariocita érési faktor (acetilkolin-észteráz-aktivitás -o-) elúciós profilját mutatja, ahol az elúciót NaCl-koncentrációgradienssel végeztük (0–0,1 mol/l), és 1–120. frakciót gyűjtöttünk.

A 2. ábra egy Phenyl-Sepharose oszlopról nyert protein (A 280 -.-) és megakariocita érési faktor (acetilkolin-észteráz-aktivitás -o-) elúciós profilját mutatja, ahol az elúciót ammónium-szulfát-koncentrációgradienssel (30–0%), valamint etilén-glikol-koncentrációgradienssel (0–50%) végeztük, az 1–100. frakciót összegyűjtöttünk, majd 50%-os etilén-glikollal folytatva az eluálást, a 101–120. frakciókat gyűjtöttük.

A 3. ábra egy S-Sepharose oszlopról nyert protein (A 280 -.-) és megakariocita érési faktor (acetilkolin-

észteráz-aktivitás -o-) elúciós profilját mutatja, ahol az elúciót NaCl-koncentrációgradienssel végeztük (0–0,5 mol/l) és az 1–100. frakciót gyűjtöttük.

A 4. ábra egy Hiroad 26/60 Superdex 75 Pg oszlopról nyert protein (A 280 -.-) és megakariocita érési faktor (acetilkolin-észteráz aktivitás -o-) elúciós profilját, valamint a kapott frakciók SDS–PAGE-val vizsgált eredményét (az ábra alsó része) mutatja.

Az 5. ábra a tisztított megakariocita érési faktor SDS–PAGE-vel kapott elektroforézismintáját mutatja.

A 6. ábra a tisztított megakariocita érési faktor izoelektromos fókuszálásának eredményét mutatja.

A 7. ábra a tisztított megakariocita érési faktor SDS–PAGE szerinti cukorlánc-vizsgálatának eredményét mutató elektroforetikus minta, ahol az 1. oszlop a kezeletlen megakariocita érési faktort, a 2. oszlop az endoglikozidáz F-fel kezelt megakariocita érési faktort mutatja (megjegyezzük, hogy a 35 kD közelében látható csíkot az enzimkészítmény adja).

A 8. ábrán látható grafikon tisztított megakariocita érési faktor (55 kD protein) jelenlétében vagy anélkül, illetve IL–6 hozzáadásával vagy anélkül 5 napon át tenyésztett egércsontvelősejtekből származó megakariociták acetilkolin-észteráz-aktivitását hasonlítja össze.

A 9. ábra 4 napon át az IL–3 hozzáadását követően, tisztított megakariocita érési faktor jelenlétében (B), illetve anélkül (A) tenyésztett egércsontvelősejtek acetilkolin-észteráz-festődését mutatja.

A 10. ábra 4 napon át az IL–3 hozzáadását követően, tisztított megakariocita érési faktor jelenlétében (B), illetve anélkül (A) tenyésztett egércsontvelősejtek May–Grünwald–Giemsa-festődését mutatja.

A 11. ábra RNS meghatározását mutatja DNS-próba segítségével (a 2.1 példában ismertetett, KY100 és N1065 segítségével amplifikált PCR-termék), ahol az RNS-t rekombináns vírussal (TP055-Bm NPV) fertőzött, a megakariocita érési faktort kódoló gént tartalmazó *Bombyx mori* sejtenyészetből, vad típusú vírussal fertőzött sejtekből (B6E) (A sáv), illetve nem transzformált sejtekből (C sáv) vontuk ki.

A 12. ábra szerinti grafikon megakariocita érési faktor (TP55) expresszálsát mutatja *Bombyx mori* hemolimfában Matrex Blue A oszlopkromatográfiával végzett tisztítást követően.

A megakariocita érési faktor izolálására szolgáló kiindulási anyagként humán sejteket, például humán karcinómasejteket, előnyösen humán epidermoid karcinómasejteket, még előnyösebben proteinmentes tápfolyadékban tenyésztett humán epidermoid A431 karcinómasejteket használtunk.

A fent meghatározott megakariocita érési faktoron kívül a találmány tárgyát képezik transzformánsokból, például géntechnikai eljárással előállított sejtekből vagy állatokból nyerhető és a fent meghatározott megakariocita érési faktorról azonos aminosavszekvenciával rendelkező megakariocita érési faktorok, illetve olyanok, amelyekben a fent említett megakariocita érési faktor aminosavszekvenciájának egy része deletált vagy a fent említett megakariocita érési faktor aminosavszekvenciájának egy részét egyéb aminosavval vagy aminosav-

szekvenciával helyettesítettük vagy amelyben ahhoz egy vagy több aminosavszekvenciát adtunk vagy amelyek az említett módosítások kombinációját tartalmazzák.

5 A találmány kiterjed továbbá a 30. szekvencia szerinti aminosavszekvenciával rendelkező megakariocita érési faktorra, illetve olyan megakariocita érési faktorokra, melyekben a 30. szekvencia szerinti aminosavszekvencia egy része deletált vagy a 30. szekvencia szerinti aminosavszekvencia egy részét egyéb aminosav vagy aminosavszekvencia helyettesíti vagy amelyben a 30. szekvencia szerinti aminosavszekvenciához egy vagy több aminosavszekvenciát adtunk, vagy amelyek az említett módosítások kombinációját tartalmazzák.

15 A találmány tárgyát képezik a fent említett megakariocita érési faktorokat kódoló gének is. A találmány kiterjed továbbá a gén felhasználásával a megakariocita érési faktorok génrekombinációs technikával történő előállítására szolgáló eljárásra. A génrekombinációs technika szokásos eljárásokat foglal magában a natív megakariocita érési faktor aminosavszekvenciáját kódoló, mesterségesen előállított vagy természetes polinukleotidok felhasználásával vagy olyanokéval, de azokra nem korlátozódva, amelyekben a fent említett megakariocita érési faktor aminosavszekvenciájának egy része deletált vagy a fent említett megakariocita érési faktor aminosavszekvenciájának egy részét egyéb aminosavval vagy aminosavszekvenciával helyettesítettük vagy amelyben ahhoz egy vagy több aminosavszekvenciát adtunk, vagy amelyek az említett módosítások kombinációját tartalmazzák.

25 A fent említett különböző módosításokat szokásos eljárásokkal, például egy meghatározott helyen létrehozott mutagenézissel végezhetjük.

35 A módosításnál, például hozzáadásnál, deletálásnál vagy helyettesítésnél szereplő aminosavak száma nem korlátozott, azonban az aminosavak hozzáadása esetén az aminosavak száma függ például a hibrid proteinben a találmány szerinti megakariocita érési faktorról együtt alkalmazott funkcionális peptid vagy a találmány szerinti faktorhoz kapcsolt jelzőpeptid aminosavainak számától, nevezetesen a módosítás céljától. Deletálás esetén az aminosavak számát úgy tervezzük vagy határozzuk meg, hogy megtartsuk a megakariocita érési faktor aktivitását, ez előnyösen 1–30, előnyösebben 1–20, vagy a deletált szakasz kívül eshet a találmány szerinti faktor aktív szakaszán. Helyettesítés esetében az aminosavak számát úgy tervezzük vagy határozzuk meg, hogy megtartsuk a megakariocita érési faktor aktivitását, ez előnyösen 1–10, előnyösebben 1–5.

50 A hatékony expressziót biztosíthatja egy szignálszekvencia hozzáadása vagy módosítása, a vektor/gazdaszervezet rendszer helyes megválasztása, vagy az expressziót szabályozó szekvencia módosítása. A gazdaszervezetet megválaszthatjuk továbbá úgy, hogy az glükozilezett terméket állítson elő. Ezenkívül az 1–9. szekvenciák szerinti aminosavszekvenciák egyikét kódoló polinukleotidot felhasználhatjuk egy gén klónozására DNS-próbaként.

A találmány kiterjed továbbá az olyan gyógyászati készítményekre, amelyek hatóanyagként megakariocita érési faktort tartalmaznak. A gyógyászati készítményt előnyösen trombocitopénia kezelésére alkalmazzuk.

A találmány szerinti megakariocita érési faktor alkalmazható továbbá ismert eljárás szerint fajlagos ellenanyagok előállítására.

A találmány szerinti megoldás részletes ismertetése.

(1) Kiindulási anyag

A találmány szerinti új protein előállítására kiindulási anyagként a humán epidermoid karcinóma eredetű A431 sejtek (ATCC CRL 1555) tenyésztésének felülűszoját használtuk, mely sejteket Yamaguchi eljárása szerint képessé tettük arra, hogy proteinmentes tápfolyadékban szaporodjanak [Yamaguchi N. és munkatársai, Cancer Res., 50, 7008, (1991)]. Ezt a sejtvonalat SBM 330 humán epidermoid karcinómasejteknek neveztük, és 1992. július 1-jén FERM BP-3911 nyilvántartási számon letétbe helyeztük a „Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology” gyűjteményében [1–3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi Ibraki-ken (307), Japán].

(2) A megakariocita érési faktor meghatározására szolgáló eljárás

A megakariocita érési faktor meghatározására megakariocita eredetű sejtvonalak (például CMK sejtek vagy abból származó sejtek) vagy egércsontvelősejtek alkalmazhatók. Az acetilkolin-észteráz-aktivitás meghatározását például, amelyről ismert, hogy fajlagosan egérmegakariocitákban található, egércsontvelősejtek felhasználásával végeztük Ishibashi és munkatársai eljárása szerint [Ishibashi T. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 5953, (1989)]. A megakariociták hisztokémiai meghatározását tenyésztett csontvelősejtek acetilkolin-észteráz-festésével, valamint May–Grünwald–Giemsa szerinti festésével, és a festődött sejtek alakjának megfigyelésével végeztük.

(3) A megakariocita érési faktor tisztítása

A megakariocita érési faktor tisztítható például proteínmentes tápfolyadékban tenyésztett A431 sejtenyészet felülűszojából kiindulva, ultraszűrőssel koncentrálván, majd oszlopkromatográfia alkalmazásával, például Matrex Blue A (Amicon), Q-Sepharose (Pharmacia), fenil-Sepharose (Pharmacia), S-Sepharose (Pharmacia), és Hiload 26/60 Superdex 75 (Pharmacia) oszlopok alkalmazásával külön-külön vagy ezek kombinációjával. A proteintartalmat 280 nanométeren mértük.

(4) A megakariocita érési faktor részleges aminosavszekvenciájának meghatározása

Aminosavszekvencia meghatározása céljából a 3. lépés szerint tisztított megakariocita érési faktort proteázal, például Achromobacter Protease I (API) használatával 37 °C-on, 2 órán át fragmensekké emésztettük. A kapott peptidfragmenseket elválasztottuk, és reverz fázisú HPLC segítségével YMC–Pack AM–303 oszlop alkalmazásával (acetonitrilgradiens 0,1%-os trifluoracettsavban) visszanyertük. Az így kapott peptidfragmenseket szekvenátorral, például gázfázisú szekvenátorral, mint például az Applied Biosystem gyártmá-

nyú készülékkel vizsgáltuk. Az adott tisztítási eljárást és a megakariocita érési faktor sajátosságainak részletes leírását az 1. példában ismertetjük. Szintén a találmány tárgyát képezi egy megakariocita érési faktort kódoló gén. A gén lehet mRNS-ről, genomiális RNS-ről vagy szintetikus DNS-ről előállított cDNS. A cDNS-t polimeráz-láncreakcióval (PCR) klónozzhatjuk a fent említett humán sejtekből, például humán epidermoid karcinómasejtekből, mint például az A431 sejtekből tisztított megakariocita érési faktor 1. példában ismertetett részleges aminosavszekvenciája alapján tervezett DNS-(nukleotid) primerek felhasználásával. A klónozás részleteit az 1. és 2. példában ismertetjük.

A találmány szerinti gén magában foglal továbbá megakariocita érésifaktor-aktivitással rendelkező proteint vagy glükoproteint kódoló és a 30. szekvencia szerinti nukleotidszekvenciával hibridizáló DNS-eket. A 2. példában klónozott DNS nukleotidszekvenciáját és a nukleotidszekvencia alapján következtetett aminosavszekvenciát a 30. szekvencia ismerteti.

Miután egy aminosavsorrendet meghatároztunk, különböző mutációt hordozó megakariocita érési faktorokat, például olyan polipeptideket tervezhetünk és állíthatunk elő, amelyekben változatlan megakariocita érésifaktor-aktivitás mellett egy vagy több aminosavatadtunk a natív aminosavszekvenciához vagy a 30. szekvencia szerinti aminosavszekvenciához vagy olyan polipeptidet, amelyben változatlan megakariocita érésifaktor-aktivitás mellett egy vagy több aminosavat deletáltunk a natív aminosavszekvenciából vagy a 30. szekvencia szerinti aminosavszekvenciából vagy olyan polipeptideket, amelyekben változatlan megakariocita érésifaktor-aktivitás mellett egy vagy több aminosavat egy vagy több más aminosavval helyettesítettünk a natív aminosav-szekvenciában, vagy a 30. szekvencia szerinti aminosavszekvenciában, vagy olyan polipeptideket, amelyek változatlan megakariocita érésifaktor-aktivitás mellett a fent említett módosítások kombinációját, például aminosavak hozzáadását, deletálását és/vagy helyettesítését tartalmazzák.

Bár a találmány tárgyát a 30. szekvencia szerinti nukleotidszekvencia képezi, a találmány szerinti megakariocita érési faktort kódoló gének nem korlátozódnak arra. Mivel a találmány szerinti natív megakariocita érési faktor aminosavszekvenciáját, vagy egy mutációt hordozó megakariocita érési faktor aminosavszekvenciáját meghatároztuk, a genetikai kód degeneráltságának következtében különböző, azonos aminosavszekvenciát kódoló nukleotidszekvenciákat tervezhetünk és állíthatunk elő. Ebben az esetben előnyösen a választott gazdaszerkezetben nagy gyakorisággal használt kodonokat alkalmaztunk.

A találmány szerinti megakariocita érési faktort kódoló gént előállíthatjuk cDNS-ként a 2. példában ismertetettek szerint, azonban a gén nem korlátozódik cDNS-re. Nevezetesen, miután a natív megakariocita érési faktor aminosavszekvenciáját kódoló nukleotidszekvenciát meghatároztuk, a natív megakariocita érési faktort kódoló gént klónozzhatjuk cDNS-ként az itt ismertetett stratégiától eltérő eljárással, ezenkívül a ki-

teket körülbelül 7 napig a kiindulási tápfolyadékban tenyészítettük, 20 liter/nap mennyiségben proteinmentes tápfolyadékot adtunk a tenyészethez, ezzel egy időben a tápfolyadékot ugyanilyen arányban eltávolítottuk a tenyészetéről. Ennek eredményeképpen a szérumot tartalmazó kiindulási tápfolyadékot körülbelül 100 liter proteinmentes tápfolyadék hozzáadásával teljes egészében lecseréltük.

Ezután folyamatosan eltávolítottuk a sejtenyészet felülúszóját, így 1000 liter sejtenyésztő felülúszót nyertünk. Az így kapott sejtenyésztő felülúszó egy részét (300 liter) 2 literre koncentráltuk be ultraszűrőmembránnal (Milipore, Bedford, MA; 10 000 dalton molekulatömeg pórushatár), és a koncentrátumot 20 mmol/liter Tris/HCl pufferrel (pH 7,4) szemben dializáltuk.

(2) Megakariocita érésifaktor-meghatározás csontvelősejtek felhasználásával.

Nőstény BDF-egerek combcsontjából mieloid sejteket nyertünk, és alfa-MEM tápfolyadékban (Flow Laboratories, Inc. Mc Lean, VA, USA) szuszpendáltunk. Különböző sűrűségű perkollrétegeket (Pharmacia LKB Biotechnology, Tokyo) rétegeztünk egymásra, ezt követően ezekre töltöttük a csontvelősejteket, majd 400 g-n 20 percig ülepítettük. Az 1,07 g/ml és az 1,08 g/ml sűrűségű rétegek határáról összegyűjtöttük a mononukleáris sejteket, 10% FSB-t tartalmazó alfa-MEM tápfolyadékkal egyszer mostuk, és 0,5 mmol/l diizopropil-fluor-foszfátot tartalmazó alfa-MEM tápfolyadékban szuszpendáltuk. A szuszpenziót ezután egy műanyag sejtenyésztő edénybe (Corning, NY, USA) töltöttük, és 37 °C-on 5% szén-dioxid és 95% levegő atmoszférában 2 órán át tenyésztettük. A tenyésztés során annak kezdetétől számítva 1 óra múlva a sejtenyésztő edényt újracseréltük. A tenyésztést követően a sejteket 10% FSB/alfa-MEM tápfolyadékkal háromszor mostuk. Az ily módon nem letapadó csontvelő eredetű mononukleáris sejteket 10% FSB/1% BSA/0,1 mmol 2-merkaptoetanol alfa-MEM tápfolyadékban szuszpendáltuk, majd 5×10^4 sejt/rekesz mennyiségben 96 rekeszű mikrolemez (Corning) rekeszeibe oltottuk. A vizsgálati mintához szükség szerint 25 egység/ml egér eredetű rekombináns IL-3-t (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) és 1–2 mikrogramm/ml anti IL-6 ellenanyagot (Boehringer Mannheim, Mannheim, NSZK) adtunk.

A tenyésztést 37 °C-on 5% CO₂ – 5% O₂ – 90% N₂ atmoszférában végeztük 4–5 órán keresztül. Miután a sejteket a mikrolemez rekeszeiben tenyésztettük, azokat kétszer PBS-pufferrel mostuk, 180 mikroliter 0,2%-os (tömeg/térfogat) Triton X-100, 1 mmol/l EDTA, 0,12 mol/l NaCl, 50 mmol/l HEPES (pH 7,5) összetételű puffer hozzáadásával lizáltuk, és 20 mikroliter 5,6 mmol/l koncentrációjú acetiltiokolin-jodid szubsztátot adtunk hozzájuk. Egy órán át szobahőmérsékleten rázás mellett végzett tenyésztést követően 20 mikroliter oldatot fluoreszcens vizsgálat céljából mikrolemezre (Dynatech Micro Fluor „B” lemez) vittünk át. A mikrolemez rekeszeihez 20 mikroliter 0,4 mmol/l koncentrációjú 7-dietil-amino-3-(4'-maleimidil-fenil)-4-metilkumarint, valamint 160 mikroliter 0,2%-os (tömeg/tér-

fogat) Triton X-100-t, 1 mmol/l EDTA-t, és 50 mmol/l nátrium-acetátot tartalmazó puffert (pH 5,0) adtunk, majd fluoriméterrel fluoreszcensjel-kibocsátást mérünk (excitáció 365 nanométer, emisszió 450 nanométer).

Az acetilkolin-észteráz-festés céljából a sejteket Cytospin centrifugában ülepítettük, hogy a sejteket fedőlemezeire tapasszuk le, 5%-os glutaraldehidet tartalmazó 10 mmol/l koncentrációjú foszfátpufferrel (pH 6,7) 15 percig fixáltuk, és szubsztátként Mizoguchi eljárása szerint (Method for Culturing Hemopoietic Stem Cells, Chugai Igaku, 1986, szerk. Y. Miura, 82–88) acetiltiokolin-t használtunk. Nevezetesen, miután a sejteket fixáltuk, a fedőlemezeket 0,1 mol/l koncentrációjú foszfátpufferrel (pH 6,0) mostuk, és mindegyik fedőlemezt 1,5 ml 0,67 mg/ml acetiltiokolin-jodidot tartalmazó 0,1 mol/l foszfátpuffer (pH 6,0), 0,2 ml 30 mmol/l CuSO₄, 0,2 ml 5 mmol/l töménységű kálium-ferri-cianid, valamint 0,1 ml térfogatú 0,1 mol/l koncentrációjú nátrium-citrát elegyével rétegeztük felül. A fedőlemezeket 4 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd vízzel mostuk. A hematológiában jól ismert May-Grünwald-Giemsa-festést végeztünk az E. Merck cég (Darmstadt, Németország) reagenseinek felhasználásával, a festést 4 percen át May-Grünwald-festékkel, majd 10 percen át Giemsa-festékkel végeztük.

(3) A megakariocita érési faktor tisztítása

A 431 sejtek tápfolyadékának koncentrátumát dializáltuk és ülepítettük, hogy felülúszót kapjunk, amelyet ezután 20 mmol/l Tris/HCl pufferrel (pH 7,4) ekvilibrált Matrix-Blue A oszlopra vittünk fel. Miután az oszlopot ugyanazzal a pufferrel mostuk, a kötődött frakciót 2 mol/l NaCl-t tartalmazó azonos összetételű pufferrel eluáltuk. A fent említett eljárással meghatározható megakariocita érésifaktor-aktivitást a kötődött frakcióban találtuk. A kötődött frakciót ezért 20 mmol/l koncentrációjú Tris/HCl pufferrel szemben dializáltuk, és az előbbi pufferrel ekvilibrált Q-Sepharose oszlopra vittük fel. Az oszlopot alaposan mostuk, és a megakariocita érési faktort NaCl-gradienssel (lásd 1. ábra) eluáltuk. Ezt a faktort a 0,3–0,5 mol/l NaCl-koncentrációk közelében eluáltuk.

A Q-Sepharose oszlopról nyert aktív frakciót 30%-os ammónium-szulfáttal telítettük, majd 30% ammónium-szulfátot tartalmazó 20 mmol/l Tris/HCl pufferrel (pH 7,4) ekvilibrált fenil-Sepharose oszlopra vittük. A megakariocita érési faktort párhuzamosan alkalmazott ammónium-szulfát (30–0%), valamint etilén-glikol- (0–50%) koncentrációgradiensekkel eluáltuk (lásd 2. ábra). Az anti-IL-6 ellenanyag jelenlétében mért megakariocita érési faktort a koncentrációgradiens elején figyeltük meg több frakcióban.

Az így nyert frakciókat összekevertük, 50 mmol/l MES/NaOH pufferrel (pH 6,0) szemben alaposan dializáltuk, és azonos összetételű pufferrel ekvilibrált S-Sepharose oszlopra vittük fel. A kötődött frakciót 0–0,5 mol/l koncentrációgradienssel eluáltuk (lásd 3. ábra). Bár az aktivitás széles határok között változott, viszonylag nagy aktivitást találtunk a koncentrációgradiens elején. Az S-Sepharose oszlopról nyert

frakciókat egy Hilord 26/60 Super Dex 75 (Pharmacia) oszlopra vittük fel géliszűrési céljából. Az alkalmazott oszlopot előzőleg ugyanolyan összetételű pufferrel ekvilibráltuk, és az elúciót is azonos összetételű pufferrel végeztük (lásd 4. ábra). Megakariocita érésifaktor-aktivitást az 55–57 kDa molekulatömegeknek megfelelő pozíció közelében eluáltunk.

A fent említett lépések szerint 300 liter A431 eredetű sejtenyészet felülúszójából körülbelül 80 mikrogramm, SDS–PAGE-vizsgálattal az 55–57 kDa molekulatömegek közelében két csíkot adó frakciót nyertünk (lásd 5. ábra). A két csík egybeesett az aktivitással (1. ábra). Arra a következtetésre jutottunk tehát, hogy az említett frakcióban megfigyelt két csík megfelel a kívánt megakariocita érési faktornak.

(4) A megakariocita érési faktor sajátosságai

A találmány szerinti megakariocita érési faktor a következő tulajdonságokkal rendelkezik.

1) Molekulatömeg: körülbelül 55 kDa (géliszűrési és SDS–PAGE-vizsgálattal) (4. és 5. ábra).

A találmány szerinti faktor SDS–PAGE-vizsgálattal két csíkot ad, és nem mutat mobilitásbeli különbséget redukáló és nem redukáló feltételek mellett. A faktor tehát nem rendelkezik molekulák közti diszulfidhíddal.

2) Izoelektromos pont: $6,5 \pm 0,5$ (6. ábra).

A fent említett sávon belül több csík figyelhető meg.

3) A találmány szerinti faktor fent említett heterogenitása magyarázható a glükoprotein cukorláncszerkezetének heterogenitásával. Nevezetesen, ha a találmány szerinti faktort endoglikozidáz F-fel kezeljük, amely egy, az aszparaginhoz kötött cukrokat eltávolító enzim, a találmány szerinti faktor molekulatömege körülbelül 40 kDa-ra csökkent, és ugyancsak csökkent az SDS–PAGE-vizsgálattal megfigyelhető heterogenitás mértéke (lásd 7. ábra). Ezenkívül, ha az egyetlen, valamint a két csíkot adó frakciót API-val emésztettük, és reverz fázisú HPLC-vel végzett frakcionálással vizsgáltuk a peptideket, a két frakció között nem volt megfigyelhető különbség.

4) A találmány szerinti faktor tartalmazza az 1–9. aminosavszekvenciák legalább egyikét.

5) Biológiai aktivitás

Abban az esetben, ha egérből származó csontvelősejteket tisztított megakariocita érési faktor és IL–3 jelenlétében tenyésztettünk, a megakariociták proliferációját és differenciálódását figyeltük meg (8., 9. és 10. ábra). A 8. ábra mutatja a megakariociták acetilkolin-észteráz-aktivitásának mérési eredményeit; a 9. ábra mutatja a tenyésztett sejtek acetilkolin-észteráz-festődését ($\times 20$); és a 10. ábra mutatja a tenyésztett sejtek May–Grünwald–Giemsa-festésének eredményét ($\times 100$). Mind a 9., mind a 10. ábrán a megakariociták számának emelkedése figyelhető meg megakariocita érési faktor jelenlétében (B) összehasonlítva az annak hiányában tapasztalttól (A).

(5) A megakariocita érési faktor szerkezete

A tisztított megakariocita érési faktor szerkezetének megállapítása céljából a faktort API-val emésztettük, és meghatároztuk a kapott fragmensek szerkezetét. Az API-val való emésztést követően az egyes frag-

menseket reverz fázisú HPLC felhasználásával szétválasztottuk, és meghatároztuk a megfelelő frakciók szerkezetét. Eredményeink szerint a peptidfragmensek az 1–9. szekvenciák szerinti aminosavszekvenciákkal rendelkeznek.

2. példa

A megakariocita érési faktor cDNS-szerkezetének meghatározása

1. *A megakariocita érési faktor cDNS nukleotidszekvenciájának vizsgálata PCR-technikával (1)*

Az NI065 (10. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti 449–486. nukleotidoknak), és az NI067 (11. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti 1049–1080. nukleotidoknak) oligonukleotidokat a 3., illetve 4. szekvenciák szerinti aminosavszekvenciák alapján meghatározott nukleotidszekvenciák alapján szintetizáltuk. Az A431 sejtekből ISOGEN felhasználásával (Wako Pure Chemical) teljes RNS-t tisztítottunk a gyártó utasításai szerint. A teljes RNS-től megtisztítottuk a poly-A-val rendelkező RNS-frakciót, és a reakciót 3'-RACE vizsgálókészlet (Gibco BRL) felhasználásával végeztük. Nevezetesen, a polimeráz-lánreakciót (PCR) a fent említett NI065 oligomer, valamint a 3'-RACE vizsgálókészletben (Gibco BRL) található 3'-RACE adaptor primer oligomer (12. szekvencia) felhasználásával végeztük a vizsgálókészlethez mellékelt utasítások szerint.

A reakció termékét ezután egy második PCR-reakciónak vetettük alá az NI067 primer, valamint a 3'-RACE vizsgálókészletben (Gibco BRL) található 3'-RACE adaptor primer oligomer felhasználásával, így egy körülbelül 900 bázispár hosszúságú DNS-fragmenst kaptunk. Ezt követően egy PCR-termékek direkt szekvenciameghatározására kidolgozott eljárással [U. Gyllenstein és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7652, (1988)] a körülbelül 900 bázispár hosszúságú DNS-fragmenst használtuk közvetlenül a reakció szubsztrátjaként, hogy meghatározzuk a proteint képviselő rész és a proteinrészről 3'-irányban található rész nukleotidszekvenciáját egy Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing vizsgálókészlet (Applied Biosystem), valamint egy fluoreszcens nukleotidszekvenáló (Applied Biosystem, Type 370A) felhasználásával a gyártó utasításai szerint. Eredményül a 30. szekvencia szerinti 1081–1950. nukleotidszekvenciát kaptuk.

Ennek a szekvenciának alapján szintetizáltuk a KY100 oligomert (13. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti 1255–1236. nukleotidszekvenciának). Az NI065, valamint a 3'-RACE vizsgálókészletben (Gibco BRL) található 3'-RACE adaptor primer oligomer felhasználásával végzett PCR-reakcióban kapott terméket az NI065 és a KY100 oligomerek felhasználásával egy további PCR-reakcióban használtuk fel a reakció szubsztrátjaként. A reakció eredményeképpen egy 807 bázispárból álló DNS-fragmenshez jutottunk.

Ezt a 807 bázispárból álló DNS-fragmenst használtuk a reakció szubsztrátjaként, hogy annak nukleotidszekvenciáját meghatározzuk egy Taq Dye Deoxy

Terminator Cycle Sequencing vizsgálókészlet (Applied Biosystem), valamint egy fluoreszcens nukleotidszekvenáló (Applied Biosystem, Type 370A) segítségével a gyártó utasításai szerint. Eredményül a 30. szekvencia szerinti 487–1080. nukleotidszekvenciát kaptunk.

Ennek a szekvenciának alapján szintetizáltuk az NI073 oligomert (14. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti a 864–886. szekvenciának), az NI074 oligomert (15. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti a 1012–992. szekvenciának), valamint az NI075 oligomert (16. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti a 802–782. szekvenciának).

2. A megakariocita érési faktor cDNS nukleotidszekvenciájának vizsgálata PCR-technikával (2)

A. mRNS előállítása megakariocita érési faktort expresszáló sejtvonalból (A431)

1,1 gramm fagyasztott humán epidermoid karcinoma-sejtvonalból (A431) 25 mikrogramm mRNS-t extraháltunk és tisztítottunk egy, a Pharmacia LKB-től beszerzett RNS-extraháló készlet, valamint egy mRNS-tisztító készlet segítségével.

B. DNS-fág génkönyvtár létrehozása megakariocita érési faktort expresszáló sejtvonalból (A431)

(1) cDNS szintézise

5 mikrogramm A431 eredetű mRNS-ről cDNS-t szintetizáltunk egy, a Pharmacia LKB-től beszerzett Time Saver cDNS-szintetizáló készlet segítségével. Először 5 mikrogramm 20 mikroliter desztillált vízben oldott dietil-prokarbonáttal (DEPC) kezelt, mRNS-t 10 percig 65 °C-on hevítettünk, majd jégen lehűtöttük. Ehhez 11 mikroliter első szál reakciókeveréket, 1 mikroliter DTT-oldatot, 1 mikroliter 130 egység/ml koncentrációjú NotI/oligomer 18 primer oldatot (Pharmacia-LKB) adtunk és az elegyet egy órán át 37 °C-on inkubáltuk.

A reakcióelegyet a második szál reakcióelegyhez adtuk, és az elegyet 30 percig 12 °C-on, majd egy órán át 22 °C-on inkubáltuk, és ezután 10 percig 65 °C-on hevítettük. Ehhez 100 mikroliter fenol/kloroform/izomamil-alkohol (25:24:1; a továbbiakban PC) keveréket adtunk, ezt a keveréket erőteljesen összeráztuk, egy percig 14 000 g-n ülepítettük, hogy felülúszót kapjunk, amelyet azután egy Sephadex S-400 centrifugaoszlopon (Pharmacia LKB) frakcionáltunk, és így 100 mikroliter cDNS-oldatot kaptunk.

(2) Az EcoRI adaptor hozzákapcsolása

100 mikroliter cDNS-oldathoz 5 mikroliter 10 egység/ml koncentrációjú EcoRI adaptort (Pharmacia LKB), 30 mikroliter polietilénlikol-puffert, 1 mikroliter 1/5 arányban hígított ATP-oldatot, valamint 1 mikroliter T4 DNS-ligázt adtunk, és az elegyet egy órán át 37 °C-on inkubáltuk. Miután az elegyet 10 percig 65 °C-on hevítettük, ahhoz 1,5 mikroliter ATP-oldatot, valamint 1 mikroliter T4 polinukleotid kinázt adtunk, és 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. Miután ezt 10 percig 65 °C-on hevítettük, az elegyhez 2 mikroliter 20 egység/ml koncentrációjú NotI enzimet adtunk, ezután egy órán át 37 °C-on inkubáltuk. Az elegyhez 150 mikroliter PC-keveréket adtunk, amelyet ezután erőteljesen összeráztunk, egy percig 14 000 g-n ülepített-

tünk, majd a felülúszót egy Sephadex S-400 centrifugaoszlopon (Pharmacia LKB) frakcionáltuk, és így 150 mikroliter cDNS-oldatot kaptunk.

(3) A cDNS beépítése fágvektorba, és in vitro becsomagolása

EcoRI, valamint NotI enzimekkel való emésztést követően 15 mikroliter cDNS-oldathoz 2 mikrogramm defoszforilezett lambda-gt11D (Pharmacia LKB) fágot adtunk. Etanollal való kicsapást követően a precipitátumot 8 mikroliter ligázpufferoldatban oldottuk, és az oldathoz 1 mikroliter 1/75 arányban hígított ATP-oldatot, valamint 1 mikroliter T4 DNS-ligázt adtunk, majd ezután 30 percig 16 °C-on inkubáltuk, és jégen tároltuk. Gigapack II Gold (Stratagene) felhasználásával in vitro becsomagolási reakciót végeztünk, és az említett három ligázreakció termékéből $3,22 \times 10^6$ plakkképző egységet tartalmazó rekombináns fágból álló génkönyvtárat kaptunk. Az említett génkönyvtárat *E. coli* Y1090 r- gazdatörzsben amplifikáltuk, és így milliliterenként $6,0 \times 10^{10}$ plakk-képző egységet tartalmazó A431 fág génkönyvtárat kaptunk.

C. A megakariocita érési faktort kódoló cDNS-fragmens azonosítása és izolálása PCR-technikával

(1) cDNS-inszert-fragmens amplifikálása A431 fág génkönyvtárban PCR-technikával

A PCR-reakcióhoz a milliliterenként $6,0 \times 10^{10}$ plakk-képző egységet tartalmazó A431 fág génkönyvtár-törzsoldat 10 mikroliterét (megfelel $6,0 \times 10^8$ plakk-képző egységnek) használtuk templát DNS-ként, és 5 mikroliter 10×koncentrált PCR-puffert, 8 mikroliter 1,25 mmol/l koncentrációjú 4 dNTP-keveréket, 2 mikroliter lambda-gt egyirányú primert (optikai sűrűség: 1 OD/ml) (lambda-gt11F) (17. szekvencia), 2 mikroliter lambda-gt reverz irányú primert (optikai sűrűség: 1 OD/ml) (lambda-gt11R) (18. szekvencia), valamint 1 mikroliter 5 egység/ml koncentrációjú Taq DNS-polimerázt (Perkin Elmer Cetus) adtunk, és az elegy összterfogatát DEPC-vel kezelt desztillált vízzel 50 mikroliterre egészítettük ki. 30 reakcióciklust végeztünk, az elegyet 1 percig 93 °C-on, 2 percig 55 °C-on és 3 percig 72 °C-on inkubálva, majd a reakcióelegyet 10 percig 72 °C-on inkubáltuk. 1%-os agarózgélen végzett elektroforézisvizsgálattal 0,8 kB-tól 6,0 kB-ig terjedő elmosódott mintát láttunk.

(2) PCR-vizsgálatot végeztünk templátként cDNS-inszert DNS amplifikációs fragmenskeverék, valamint TP7 (20. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti a 683-tól a 703-ig terjedő szekvenciának), /TP10, TP7/TP6 (19. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti 1036–1001. szekvenciának), TP8 (21. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti a 941–964. szekvenciának), TP10 (22. szekvencia; megfelel a 30. szekvencia szerinti a 1036-986. szekvenciának) primerek felhasználásával. A fent említett PCR-reakció termékéből 1/5000 arányú hígítást készítettünk, ennek 1 mikroliterét használtuk templát DNS-ként a következő PCR-reakcióban, ehhez 5 mikroliter 10×koncentrált PCR-puffert, 8 mikroliter 1,25 mmol/l koncentrációjú 4 dNTP-keveréket, az alább ismertetett kombinációban mindegyik primer 2 mikroliterét (1 OD/ml), valamint

1 mikroliter Perfect Match-t (Stratagene) adtunk, és az elegy ösztérfogatót DEPC-vel kezelt desztillált vízzel 49 mikroliterre egészítettük ki.

A reakcióelegyet 5 percig 95 °C-on, és 5 percig 60 °C-on hevítettük, ehhez 1 mikroliter 5 egység/ml koncentrációjú Taq DNS-polimerázt (Perkin Elmer Cetus) adtunk, és 30 reakcióciklust végeztünk úgy, hogy az elegyet 1 percig 94 °C-on, 2 percig 60 °C-on, és 3 percig 72 °C-on inkubáltuk, majd a reakcióelegyet 10 percig 72 °C-on inkubáltuk. Primerként TP7/TP10, TP7/TP6, TP8/TP10 és TP8/TP6 primerpárokat használtunk. A PCR-reakció termékét 2%-os agarózgélben végzett elektroforézissel vizsgálva az egyes primer kombinációknak megfelelően 354 bázispár, 354 bázispár, 96 bázispár és 96 bázispár hosszúságú DNS-fragmenseknek megfelelő csíkokat láttunk.

(3) A kapott PCR amplifikációs termék (354 bázispár hosszúságú) elsődleges szekvenciájának meghatározása TP7/TP10, valamint TP7/TP6 primerek segítségével

A TP7/TP10, valamint TP7/TP6 primerek felhasználásával kapott említett PCR amplifikációs terméknek (354 bázispár hosszúságú) megfelelő csíkot az elektroforézist követően kivágtuk a 2%-os agarózgélből, és a kivágott agarózgdarabokhoz 50 mikroliter DEPC-vel kezelt desztillált vizet adtunk, és az elegyet 30 percig 45 °C-ra hevítettük. Ennek az oldatnak a 2 mikroliteréhez, mint templát DNS-hez adtunk 5 mikroliter 10×koncentrált PCR-puffert, 8 mikroliter 1,25 mmol/l koncentrációjú 4 dNTP-keveréket, az egyes primer kombinációk 2 mikroliterét (1 OD/ml), valamint 1 mikroliter Perfect Match-t (Stratagene), és az elegy ösztérfogatót DEPC-vel kezelt desztillált vízzel 49 mikroliterre egészítettük ki. A reakcióelegyet 5 percig 95 °C-on, és 5 percig 60 °C-on hevítettük, 1 mikroliter 5 egység/ml koncentrációjú Taq DNS-polimerázt (Perkin Elmer Cetus) adtunk hozzá, és 30 reakcióciklust végeztünk az elegyet 1 percig 94 °C-on, 2 percig 60 °C-on, és 3 percig 72 °C-on inkubálva, majd a reakcióelegyet 10 percig 72 °C-on inkubáltuk. A fent említett PCR-reakcióhoz primerként TP7/TP10, TP7/TP6 primereket használtunk. A PCR-reakcióval kapott csíkokat (mindegyik 354 bázispár hosszúságú csíkot) az elektroforézissel kapott 2%-os agarózgélből kivágtuk, extraháltuk, és tisztítottuk, és a terméket pCRII-be (Invitrogen) inszertáltuk, amelyet ezután *E. coli* INV-alfa-F' (Invitrogen) gazdatörzsbe transzformáltunk. Plazmid DNS-t extraháltunk és tisztítottunk, majd a 354 bázispárból álló DNS-fragmens inszertálását EcoRI emésztéssel igazoltuk.

A DNS-inszert-fragmens elsődleges szerkezetét M13 egyirányú primer (M13F) (23. szekvencia) és M13 reverz irányú primer (M13R) (24. szekvencia) felhasználásával határoztuk meg az Applied Biosystem által gyártott automatikus szekvenálókészülékkel (370A modell). Egy 296 bázispár hosszúságú szekvenciát kaptunk eredményül, amely megfelelt a 30. szekvencia szerinti 704-től a 999-ig terjedő nukleotidszekvenciának, ez a szekvencia C-terminálisan tartalmazza a 9. szekvencia szerinti 3 aminosavat (XRK; azonban a DNS

nukleotidszekvencia szerint ERK), amely megfelel a TP7 primer 5'-végi részének, N-terminálisan tartalmazza a 6. szekvencia szerinti 5 aminosavat (ADLSG), amely megfelel a TP6 primer 3'-végi részének, valamint az 5. szekvencia szerinti 8 aminosavat (YLRLGLK), amely megfelel a TP8 primernek, bizonyítva, hogy a PCR-reakció terméke (mindegyik 354 bázispár hosszúságú fragmens) a megakariocita érési faktort kódoló cDNS részét képezi.

3. A megakariocita érési faktort kódoló cDNS kiválogatása

A cDNS-plazmid génkönyvtár előállítására megakariocitát a érési faktort expresszáló sejtvonalból (A431)

(1) Az első cDNS-szál szintézise

5 mikrogramm A431 sejtvonalból származó mRNS-ből cDNS-t állítottunk elő Super Script plazmidrendszer (GIBCO) felhasználásával. Először 2 mikroliter NotI primer adaptort adtunk 5 mikroliter dietilpirokarbonáttal (DEPC) kezelt, desztillált vízben oldott 5 mikrogramm mRNS-hez, és az elegyet 10 percig 70 °C-on hevítettük, majd jégen lehűtöttük. Ehhez 4 mikroliter 5-szörös töménységű első szál puffert, 2 mikroliter 0,1 mol/l koncentrációjú DTT-oldatot, 1 mikroliter 10 mmol/l koncentrációjú 4 dNTP-keveréket, valamint 1 mikroliter DEPC-vel kezelt desztillált vizet adtunk. A reakcióelegyhez 5 mikroliter Super Script reverz transzkriptázt adtunk, majd ezután egy órán át 37 °C-on inkubáltuk, és a reakció leállítására céljából jégre tettük.

(2) A második cDNS-szál szintézise

Az első cDNS-szál szintéziséből származó 20 mikroliter reakcióelegy 18 mikroliteréhez 93 mikroliter DEPC-vel kezelt desztillált vizet, 30 mikroliter 5-szörös töménységű második szál puffert, 3 mikroliter 10 mmol/l koncentrációjú 4 NTP-keveréket, 1 mikroliter 10 egység/mikroliter koncentrációjú *E. coli* DNS-ligázt, 4 mikroliter 10 egység/mikroliter koncentrációjú *E. coli* DNS-polimerázt, valamint 1 mikroliter 2 egység/mikroliter koncentrációjú *E. coli* RNáz H-t adtunk, és az elegyet 2 órán át 16 °C-on inkubáltuk. A reakcióelegyhez 2 mikroliter (10 egység) T4 DNS-polimerázt adtunk, és ezután 5 percig 16 °C-on inkubáltuk.

A reakcióelegyet jégre tettük, majd 10 mikroliter 0,5 mol/l koncentrációjú EDTA és 150 mikroliter PC hozzáadását követően hevesen ráztuk, 10 percig 14 000 g-n ülepítettük, és a felülúszó 140 mikroliterét új centrifugacsőbe vittük át. A felülúszóhoz 70 mikroliter 7,5 mol/l koncentrációjú ammónium-acetátot és 0,5 ml etanolt adtunk, majd 30 percig –80 °C-on állni hagytuk. Az elegyet 10 percig 14 000 g-n ülepítettük, és a felülúszó eltávolítását követően a precipitátumot 0,5 ml 70%-os etanollal mostuk és vákuumban szárítottuk.

(3) BstXI adapter hozzákapcsolása

A fent említett cDNS-precipitátumot 25 mikroliter DEPC-vel kezelt desztillált vízben oldottuk, az oldathoz 10 mikroliter 5-szörös töménységű T4 DNS-ligáz puffert, 10 mikroliter BstXI adaptort (Invitrogen) és 5 mikroliter T4 DNS-ligázt adtunk, majd 16 órán át 16 °C-on inkubáltuk. Az elegyhez 50 mikroliter PC-keveréket adtunk, hevesen ráztuk, és 5 percig 14 000 g-n

ülepítettük. 45 mikroliter felülúszót új centrifugacsőbe vittünk át. Ehhez 25 mikroliter 7,5 mol/l koncentrációjú ammónium-acetátot és 150 mikroliter etanolt adtunk, összeráztuk, és 30 percig -80°C -on állni hagytuk. Miután az elegyet a felülúszó eltávolítása céljából 10 percig 14 000 g-n ülepítettük, a precipitátumot 0,5 ml 70%-os etanollal mostuk, és vákuum alatt szárítottuk.

(4) NotI emésztés

A fent említett cDNS-precipitátumot 41 mikroliter DEPC-vel kezelt desztillált vízben oldottuk, az oldathoz 5 mikroliter REAct7 puffert, valamint 4 mikroliter NotI enzimet adtunk, majd 2 órán át 37°C -on inkubáltuk. Az elegyhez 50 mikroliter PC-keveréket adtunk, hevesen összeráztuk, 10 percig 14 000 g-n ülepítettük, és a felülúszó 45 mikroliterét új centrifugacsőbe vittük át.

(5) Az adapter eltávolítása és a cDNS-fragmensek frakcionálása

A fent említett cDNS-oldatot Quick Spin Column Linker 5 (Boehringer Mannheim) oszlopon frakcionáltuk. 50 mikroliter 40 mikrogramm/mikroliter koncentrációjú cDNS-oldatot kaptunk.

(6) cDNS beépítése fágvektorba és *E. coli* transzformálása

A fent említett cDNS-oldat 37,5 mikroliteréhez 12,5 mikroliter NotI és BstXI enzimekkel emésztett pCR/CMV (Invitrogen) vektort (29 mikrogramm/mikroliter), 400 mikroliter Takara Ligation kit A és 50 mikroliter B oldatot adtunk, az elegyet 30 percig 16°C -on inkubáltuk és 1 ml Max Efficiency kompetens sejteket (BRL) transzformáltunk, így 71 550 rekombináns klónt kaptunk. A lemezről összegyűjtöttük az összes kolóniát ($2,86 \times 10^7$ sejt/ml) és 20% glicerint tartalmazó oldatban -80°C -on tároltuk.

B. Megakariocita érési faktor cDNS-génkönyvtár szűrése kolóniahibridizációs módszerrel

Az A431 sejtvonalból nyert cDNS-plazmid génkönyvtár felhasználásával 60 darab 9 cm átmérőjű lemezen összesen 227 000 (3700/lemez) telepet kaptunk, és a telepeket nitro-cellulóz-szűrőkre vittük át. Próbát állítottunk elő úgy, hogy PCR-technikával (az előzőekben ismertetettek szerint) NI067, valamint 3'-RACE adaptor (GIBCO BRL) felhasználásával egy 900 bázispár hosszúságú PCR-terméket állítottunk elő, ezt a PCR-terméket BamHI enzimmal emésztettük, így két DNS-fragmenst (0,5 és 0,4 kilobázis) kaptunk, és a DNS-fragmenseket [alfa-32P]dCTP felhasználásával nick-transzlációnak vetettük alá.

A kolóniahibridizációs vizsgálathoz a filtereket 5-szörös koncentrációjú SSC-puffer, 25 mmol/l koncentrációjú foszfátpuffer (pH 7,4), 5-szörös koncentrációjú Denhardt-oldat, 1% SDS, 100 mikrogramm/ml hővel denaturált lazacsperma-DNS, valamint 50% formamid jelenlétében 18 órán át 42°C -on inkubáltuk, 0,1% SDS-t tartalmazó 5-szörös koncentrációjú SSC-pufferrel 20 percig 40°C -on és 20 percig 45°C -on mostuk. Az értékelést BAS 2000 film (Fuji Film) 18 órán át való exponálásával végeztük.

Első, második és harmadik szűrést végeztünk, így 4 kolóniát kaptunk, a TP290, TP308, TP310 és a

TP317 számú kolóniákat. Az inszertált cDNS mérete 1,2 kilobázis, 1,1 kilobázis, 1,2 kilobázis, illetve 1,2 kilobázis voltak. A TP290, TP310 és TP317 számú klónok megfeleltek a 30. szekvencia szerinti 685. nukleotidtól 3'-irányba eső nukleotidszakasznak.

4. Megakariocita érési faktort kódoló cDNS nukleotidszekvencia-vizsgálata PCR-technikával (3)

A. mRNS előállítása megakariocita érési faktort expresszáló sejtvonalból (HPC-Y11)

1,1 gramm fagyasztott humán hasnyálmirigy-karcinóma eredetű sejtől (HPC-Y11) 50 mikrogramm mRNS-t extraháltunk és tisztítottunk mRNS-extraháló készlet és mRNS-tisztító készlet (Pharmacia LKB) segítségével.

B. cDNS-fág génkönyvtár készítése megakariocita érési faktort expresszáló sejtvonalból (HPC-Y11)

(1) cDNS szintézise

5 mikrogramm HPC-Y11 eredetű mRNS-ről cDNS-t szintetizáltunk egy Time Saver cDNS szintetizálókészlet (Pharmacia LKB) segítségével. Először 5 mikrogramm 20 mikroliter desztillált vízben oldott dietil-prokarbonáttal (DEPC) kezelt mRNS-t 10 percig 65°C -ra hevítettünk, és jégen lehűtöttük. Az elegyhez 11 mikroliter első szál reakciókeveréket, 1 mikroliter DTT-oldatot, 1 mikroliter NotI/oligomer 18 primer oldatot adtunk, majd azt egy órán át 37°C -on inkubáltuk.

Az elegyhez 100 mikroliter második szál reakcióelegyet adtunk, és azt 30 percig 12°C -on, majd egy órán át 22°C -on inkubáltuk, ezután 10 percig 65°C -ra hevítettük. Az elegyhez 100 mikroliter fenol/kloroform/izoamil-alkohol (25:24:1; a továbbiakban PC) keveréket adtunk, ezt a keveréket hevesen összeráztuk, egy percig 14 000 g-n ülepítettük, és a felülúszót egy Sephacryl S-400 centrifugaoszlopon (Pharmacia LKB) frakcionáltuk, így 100 mikroliter cDNS-oldatot kaptunk.

(2) Az EcoRI adaptor hozzákapcsolása

100 mikroliter cDNS-oldathoz 5 mikroliter EcoRI adaptort (Pharmacia LKB), 30 mikroliter polietilenglikolt, 1 mikroliter ATP-oldatot, valamint 1 mikroliter T4 DNS-ligázt adtunk, és az elegyet egy órán át 37°C -on inkubáltuk. Miután az elegyet 10 percig 65°C -on hevítettük, ahhoz 1,5 mikroliter ATP-oldatot, valamint 1 mikroliter T4 polinukleotid kinázt adtunk, majd 30 percig 37°C -on inkubáltuk. Miután az elegyet 10 percig 65°C -ra hevítettük, 12 mikroliter NotI enzimet adtunk hozzá, azután egy órán át 37°C -on inkubáltuk. Az elegyhez 150 mikroliter PC-keveréket adtunk, amelyet ezután hevesen ráztunk, egy percig 14 000 g-n ülepítettünk, és a felülúszót ezután egy Sephacryl S-400 centrifugaoszlopon (Pharmacia LKB) frakcionáltuk, és így 150 mikroliter cDNS-oldatot kaptunk.

(3) A cDNS beépítése fágvektorba, és in vitro becsomagolása

EcoRI, valamint NotI enzimekkel való emésztést követően 15 mikroliter cDNS-oldathoz 2 mikrogramm defoszforilezett lambda-gt11D (Pharmacia LKB) fágot adtunk, etanollal való kicsapást követően a precipitátumot 8 mikroliter ligázpufferoldatban oldottuk. Az oldathoz 1 mikroliter 1/75 arányban hígított ATP-oldatot,

valamint 1 mikroliter T4 DNS-ligázt adtunk, majd ezután 30 percig 16 °C-on inkubáltuk, és jégen tároltuk. Gigapack II Gold (Stratagene) felhasználásával in vitro becsomagolási reakciót végeztünk, és az említett három ligázreakció termékéből $5,34 \times 10^6$ plakk-képző egységet tartalmazó rekombináns fágból álló génkönyvtárat kaptunk. Az említett génkönyvtárat *E. coli* Y1090 r⁻ gazdatörzsben amplifikáltuk, és így milliliterenként $1,7 \times 10^{11}$ plakk-képző egységet tartalmazó HPC–Y11 fág génkönyvtárat kaptunk.

C. A megakariocita érési faktort kódoló cDNS 5'-végi részének azonosítása és izolálása PCR-technikával

(1) A HPC–Y11 fág génkönyvtárból származó cDNS-inszert DNS-fragmens NI074 primernek megfelelő 5'-végi részének amplifikálása PCR-technikával

A PCR reakcióhoz a milliliterenként $6,0 \times 10^{10}$ plakk-képző egységet tartalmazó HPC–Y11 fág génkönyvtár-törzsoldat 1 mikroliterét (megfelel $1,7 \times 10^9$ plakk-képző egységnek) használtuk templát DNS-ként, ehhez 5 mikroliter 10×koncentrált PCR-puffert, 8 mikroliter 1,25 mmol/l koncentrációjú 4 dNTP-keveréket, 1 mikroliter lambda-gt11 egyirányú F1 primert (optikai sűrűség: 10 OD/ml) 1 mikroliter NI074 primert (optikai sűrűség: 50 OD/ml), valamint 1 mikroliter Perfect Match-t (Stratagene) adtunk, és az elegy összetérfogatát DEPC-vel kezelt desztillált vízzel 49 mikroliterre egészítettük ki. Miután az reakcióelegyet 5 percig 95 °C-ra, majd 5 percig 60 °C-ra hevítettük, ahhoz 1 mikroliter Taq DNS-polimerázt (Perkin Elmer Cetus) adtunk, és 35 reakcióciklust végeztünk az elegyet 1 percig 94 °C-on, 1 percig 60 °C-on és 2 percig 72 °C-on inkubálva, majd a reakcióelegyet 10 percig 72 °C-on inkubáltuk. 2%-os gélen végzett agaróz-gélelektroforézis vizsgálattal 0,3 kilobázistól 6,0 kilobázisig terjedő elmosódott mintát kaptunk.

(2) A PCR-vizsgálathoz templátként a lambda-gt11F1/NI074 primerekkel kapott PCR amplifikációs fragmens keveréket, valamint lambda-gt11F2 (26. szekvencia)/NI075, lambda-gt11F2/TP12 (28. szekvencia; megfelel 30. szekvencia szerinti a 703-tól a 683-ig terjedő szekvenciának), lambda-gt11F2/TP11 (27. szekvencia; megfelel 30. szekvencia szerinti 619-től az 599-ig terjedő szekvenciának), lambda-gt11F2/TP13 (29. szekvencia; megfelel 30. szekvencia szerinti 595-től az 575-ig terjedő szekvenciának), TP7/NI074, TP7/NI075, valamint NI073/NI074 primereket használtunk. A fent említett PCR-reakció terméke 1/100 arányú hígításának 1 mikroliterét használtuk templát DNS-ként a következő PCR-reakcióban, ehhez 5 mikroliter 10×koncentrált PCR-puffert, 8 mikroliter 1,25 mmol/l koncentrációjú 4 dNTP keveréket, az alább ismertetett kombinációban mindegyik primer 0,5 mikroliterét (10 OD/ml), valamint 1 mikroliter Perfect Match-t (Stratagene) adtunk, és az elegy összetérfogatát DEPC-vel kezelt desztillált vízzel 49 mikroliterre egészítettük ki.

A reakcióelegyet 5 percig 95 °C-on és 5 percig 60 °C-on hevítettük, ehhez 1 mikroliter 5 egység/ml koncentrációjú Taq DNS-polimerázt (Perkin Elmer Cetus) adtunk, és 35 reakcióciklust végeztünk az elegyet 1 percig 94 °C-on, 2 percig 60 °C-on, és 2 percig

72 °C-on inkubálva, majd a reakcióelegyet 10 percig 72 °C-on inkubáltuk.

Primerként lambda-gt11F2/NI075, lambda-gt11F2/TP12, lambda-gt11F2/TP11, lambda-gt11F2/TP13, TP7/NI074, TP7/NI075 és NI073/NI074 primerpárokat használtunk. A PCR-reakció termékét 2%-os agarózzélen végzett elektroforézissel vizsgálva az egyes primer kombinációknak megfelelően 969, bázispár, 870 bázispár, 786 bázispár, 762 bázispár, 330 bázispár, 120 bázispár, és 149 bázispár hosszúságú DNS-fragmenseknek megfelelő csíkokat kaptunk.

(3) Az F2/NI075 primerek felhasználásával kapott PCR amplifikációs termék (969 bázispár hosszúságú) PCR-vizsgálata és elsődleges szekvenciájának meghatározása lambda-gt11F/TP11, valamint lambda-gt11F/TP13 primerek segítségével

A fent említett PCR-reakció termékének (969 bázispár) 0,5 mikroliterét használtuk templát DNS-ként a következő PCR-reakcióban, ehhez 5 mikroliter 10-szeres töménységű PCR-puffert, 8 mikroliter 1,25 mmol/l koncentrációjú 4 dNTP-keveréket, 1 mikroliter lambda-gt11F primert (10 OD/ml), 1 mikroliter TP11 primert (10 OD/ml), vagy 1 mikroliter TP13 primert (OD 10/ml), valamint 1 mikroliter Perfect Match-t (Stratagene) adtunk, és az elegy összetérfogatát DEPC-vel kezelt desztillált vízzel 49 mikroliterre egészítettük ki.

A reakcióelegyet 5 percig 95 °C-on és 5 percig 60 °C-on hevítettük, ehhez 1 mikroliter 5 egység/ml koncentrációjú Taq DNS-polimerázt (Perkin Elmer Cetus) adtunk, és 35 reakcióciklust végeztünk úgy, hogy az elegyet 1 percig 94 °C-on, 2 percig 60 °C-on, és 2 percig 72 °C-on inkubáltuk, ezt követően a reakcióelegyet 10 percig 72 °C-on inkubáltuk. A PCR-reakcióban kapott csíkokat (678 bázispár, valamint 654 bázispár hosszúságú csíkot) elektroforézist követően a 2%-os agarózzélelől kivágtuk, extraháltuk, és tisztítottuk, és a terméket pCRII-be (Invitrogen) inszertáltuk, amelyet ezután *E. coli* INV-alfa-F' (Invitrogen) gazdatörzsbe transzformáltunk. A transzformánsokból extraháltuk és tisztítottuk a plazmid DNS-t, majd a 0,7 kilobázis nagyságú DNS-fragmens beépülését EcoRI emésztéssel igazoltuk. Az inszertált DNS-fragmens elsődleges szerkezetét M13 egyirányú primer (M13F) és M13 reverz irányú primer (M13R) felhasználásával határoztuk meg (Applied Biosystem által gyártott automatikus szekvenálókészülék; 370A modell).

Eredményül kaptunk egy 619 bázispár hosszúságú szekvenciát, amely megfelelt a 30. szekvencia szerinti 1-től a 619-ig terjedő nukleotidszekvenciának, és egy 133 nukleotidból álló szekvenciát, amely tartalmazta a 30. szekvencia szerinti 487-től a 619-ig terjedő nukleotidokat, és amely 2. 1 példa szerinti elsődleges szekvencia N-terminális végének bizonyult. Ezen a 619 bázispár hosszúságú fragmens belől megtalálható a 3. szekvencia szerinti 19 aminosavat (VERVDFTN-HLEDTR RNINK a DNS nukleotidszekvencia alapján), valamint a 7. szekvencia szerinti 5 aminosavat (LYDAK) kódoló szekvencia, ezzel igazoltuk, hogy a PCR-reakció termékei (mindegyik 0,7 kilobázis nagysá-

gú fragmens) a megakariocita érési faktort kódoló cDNS részét képezik.

Feltevésünk szerint a transzlációs kezdő metionin megfelel a 74. nukleotidnak, és az 5'-végi nem transzlálódó szakasz 73 bázispárból áll. Igazoltuk tehát, hogy a PCR-reakció termékei (mindegyik 0,7 kilobázis nagyságú fragmens) tartalmazzák a megakariocita érési faktor strukturális génjének N-terminális végét.

5. A megakariocita érési faktort kódoló cDNS nukleotidszekvenciájának vizsgálata PCR-technikával (4)

A HPC-Y11 eredetű megakariocita érési faktor strukturális génjének N-terminális része, és a C(3) fejezet szerinti 5'-végi nem transzlálódó szakasznak tekintett szekvencia közé eső, a 30. szekvencia szerinti 12-től 31-ig terjedő nukleotidok alapján, melyről megállapítottuk, hogy megfelel az 5'-végi nem transzlálódó résznek, szintetizáltuk az NI083 oligomert (31. szekvencia).

Az 1. fejezet szerinti A431 sejtekből előállított poli-A RNS, Preamplification System (Gibco BRL), valamint az előző készlethez mellékelt random hexamerek felhasználásával szintetizáltuk a cDNS első szálát a gyártó utasításai szerint, majd PCR-reakciót végeztünk NI083 és NI074 oligomerek, valamint Ampli Taq (Takara) felhasználásával. A reakcióban egy 1001 bázispár hosszúságú DNS-fragmenst kaptunk, amely a megakariocita érési faktornak megfelelő cDNS-fragmens.

Ez az 1001 bázispár hosszúságú PCR-termékként kapott DNS-fragmens képezte közvetlenül a szekvenálás szubsztrátját, amelyet egy Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing készlet (Applied Biosystem) és fluoreszcens szekvenátor (Applied Biosystem 370A típus) felhasználásával végeztünk a gyártó utasításai szerint. A 30. szekvencia szerinti 32-től a 486-ig terjedő nukleotidoknak megfelelő szekvenciát kaptunk. Ezenkívül a 30. szekvencia szerinti 487-től a 991-ig terjedő nukleotidszekvencia eredménye igazolta az 1. fejezetben kapott szekvencia helyességét.

Az 1. fejezetben kapott szekvenciával való összevetés alapján megállapítottuk a 30. szekvencia szerinti 32-től az 1950. nukleotidig terjedő szekvenciát, amely megfelel az A431 sejt eredetű megakariocita érési faktort kódoló cDNS nukleotidszekvenciájának.

Ennek a nukleotidszekvenciának az alapján mechanikusan transzláltuk mindhárom lehetséges olvasási keretnek megfelelő aminosavszekvenciát, és azt találtuk, hogy egyiken belül található egy olyan szakasz, amely az 1–9. szekvencia szerinti aminosavszekvenciák összességét tartalmazó folyamatos aminosavszekvenciává transzlálódik, tehát megállapítottuk a megakariocita érési faktornak megfelelő olvasási keretet.

Ezen az olvasási kereten belül találtunk egy transzlációs kezdőpontnak megfelelő metionin kodont (74–76. nukleotidok), ettől a kezdőponttól a 30. szekvencia szerinti 1213. nukleotidig terjedően pedig egy olyan szakaszt, amely az 1–9. szekvenciák szerinti aminosavszekvenciákat tartalmazó aminosavszekvenciává transzlálódik, és megállapítottuk, hogy a 30. szekvencia szerinti 74–1213. terjedő nukleotidokból álló szakasz a

megakariocita érési faktorrá transzlálódó nukleotidszekvencia.

A metionin kodont (a 30. szekvencia szerinti 71–77. nukleotidokat) tartalmazó GCAATGG nukleotidszekvencia (a 30. szekvencia szerinti 71–77. nukleotidok) megfelel a transzlációs kezdőponton gyakran található szekvenciának (G/A-N-N-A-T-G-G) [M. Kozak, Nucleic Acids Research, 9. kötet, 5233–5252 (1981)].

Tisztáztuk tehát a megakariocita érési faktor elsődleges szekvenciáját, a strukturális gént 380 aminosav alkotta, ennek alapján számított molekulatömege 42 904,43, feltételezett izoelektromos pontja pedig 6,79 volt. Az 1. szekvencia megfelel a 30. szekvencia szerinti 188–196. aminosavaknak, a 2. szekvencia a 30. szekvencia szerinti 181–187., a 3. szekvencia a 30. szekvencia szerinti 126–144., a 4. szekvencia a 30. szekvencia szerinti 325–341., az 5. szekvencia a 30. szekvencia szerinti 289–297., a 6. szekvencia a 30. szekvencia szerinti 305–324., a 7. szekvencia a 30. szekvencia szerinti 121–125., a 8. szekvencia a 30. szekvencia szerinti 284–288., a 9. szekvencia pedig a 30. szekvencia szerinti 204–213. aminosavaknak felel meg. Egy poli-A hozzáadási szignálszekvencia (AATAAA szekvencia) található továbbá a 30. szekvencia szerinti 1933–1998. nukleotidoknál.

3. példa

A431 sejt eredetű megakariocita érési faktort kódoló cDNS izolálása és identifikálása PCR-technikával, valamint expressziós vektor előállítása

Az NI078 (32. szekvencia), valamint az NI079 (33. szekvencia) oligomereket a 2. példában kapott szekvencia (30. szekvencia) alapján szintetizáltuk. Megjegyezzük, hogy az NI078 oligomer esetében a transzlációs kezdőpontot jelentő metionin kodont tartalmazó 13–37. szekvencia megfelel a 30. szekvencia szerinti 74–98. nukleotidszekvenciának, és ehhez egy EcoRI felismerő helyet (4–9. nukleotidok), valamint egy NruI felismerő helyet (8–13. nukleotidok) adtunk mesterségesen; az NI079 oligomer esetében a 17–49. szekvencia megfelel a 30. szekvencia szerinti 1237–1269. nukleotidszekvenciának, és ehhez egy EcoRI felismerő helyet (3–8. nukleotidok), valamint egy NotI felismerő helyet (9–16. nukleotidok) adtunk mesterségesen.

Az 2. példa 1. fejezetében az A431 sejtekből előállított poli-A RNS, Preamplification System készlet (Gibco BRL), valamint oligomerek, azaz az előző készlethez mellékelt random hexamerek felhasználásával szintetizáltuk a cDNS első szálát a gyártó utasításai szerint, majd PCR-reakciót végeztünk templátként a szintetizált DNS, primerként az NI078, és az NI079 oligomerek, valamint Ampli Taq (Perkin Elmer Cetus) felhasználásával. A reakcióban egy 1224 bázispár hosszúságú DNS-fragmenst kaptunk, amely a megakariocita érési faktornak megfelelő, és a megakariocita érési faktorra vonatkozó összes információt hordozó cDNS-fragmens.

Ezt a DNS-fragmenst EcoRI enzimmal emésztettük, hogy az NI078 (32. szekvencia), valamint az NI079 (33. szekvencia) oligomerekhez mesterségesen

hozzáadott EcoRI felismerő helyek folytán a megakariocita érési faktort kódoló cDNS mindkét végén kohezív végeket kapjunk. Ezt a megakariocita érési faktort kódoló cDNS-fragmenst egy pdKCR–DHFD nevezetű emlős expressziós rektor EcoRI felismerő helyére építettük be, így kaptuk a pdKCR–DHFR–TP055 expressziós vektort.

Az állati sejt eredetű pdKCR–dhfr expressziós vektor [Oikawa S. és munkatársai, Biochem. Biophys. Res. Commun., 164, 39, (19F39)] a pKCR származéka [O'Hare és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. Acad. USA, 78, 1527, (1981)] tartalmazza a SV 40 korai promotert, egy nyúlból származó béta-globin gént, valamint dhfr (dehidrofolat-reduktáz) gént. Megemlítjük, hogy az expressziós vektorral transzformált gazdasejt az *Escherichia coli* SBM 308 elnevezést kapta, és 1990. június 7-én FERM P–11506 nyilvántartási számon letétbe helyeztük az Agency of Industrial Science and Technology (1–3, Higashi 3-chome, Tsukubashi, Ibaraki) által fenntartott Fermentációs Kutató Intézetnél Japánban, és 1993. február 18-án FERM BP–4197 nyilvántartási szám alatt letétbe helyeztük a Budapesti Egyezmény értelmében.

A pdKCR–DHFR vektorba beépített megakariocita érési faktor cDNS-t tartalmazó pdKCR–DHFR–TP055 klónt Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing készlet (Applied Biosystem) felhasználásával, valamint fluoreszcens szekvenátor (Applied Biosystem, 370A modell) alkalmazásával szekvenáltuk a gyártó utasításai szerint. Az így meghatározott nukleotidszekvencia megegyezett a 30. szekvencia szerinti 99–1236. nukleotidszekvenciával, valamint az NI078 és NI079 oligomerek nukleotidszekvenciájával. A szekvenálással igazoltuk továbbá, hogy a vektorba inszertált megakariocita érési faktor cDNS az expressziós vektor promotéréhez viszonyítva helyes orientációban épült be a vektorba.

A fentiek alapján a 30. szekvencia szerinti információ ismeretében, a gyakorlatban járatos személynek könnyű feladat egy megakariocita érési faktort expresszáló sejtvonalból (például A431) a megakariocita érési faktort kódoló cDNS egésze vagy tetszőleges része amplifikációjával annak nukleotidszekvenciája meghatározása és tetszőleges expressziós vektorba való beépítése.

4. példa

A megakariocita érési faktor expresszálása Bombyx moriba

(1) *Bombyx mori* expressziós vektor előállítása

A megakariocita érési faktor cDNS-klónt (pdKCR–DHFR–TP055) az NI079 oligomerhez mesterségesen hozzáadott NotI felismerő hely hasítása céljából NotI enzimmal emésztettük. Az így előállított kohezív NotI végeket tompa végűvé alakítottuk az erre a célra szolgáló készlet segítségével (Takara Shuzo) a gyártó utasításai szerint, és a tompa végekhez XbaI linkert (Takara Shuzo) csatoltunk. Az így kapott plazmidot az NI078 oligomerhez mesterségesen hozzáadott NruI, valamint a beiktatott linkerben található XbaI felismerő helyek hasítása céljából párhuzamosan NruI, valamint

XbaI enzimekkel emésztettük, hogy NruI, valamint XbaI kohezív végekkel rendelkező megakariocita érési faktort kódoló cDNS-fragmenst kapjunk. Ezt a DNS-fragmenst egyidejűleg NruI és XbaI enzimekkel emésztett, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis vírushoz való pBm4 jelzésű baculovírus transzfer vektor (Department of Insect Genetics and Breeding National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwasi, Tukuba, Ibaraki 305, Japán) NruI felismerő helyére építettük be, így kaptuk a pBm4–TP055 plazmidot.

(2) *A TP055 rekombináns vírus előállítása*

Egy BoMo15AIIc jelzésű *Bombyx mori* embryonic eredetű sejtvonalat (Department of Insect Genetics and Breeding National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwasi, Tukuba, Ibaraki 305, Japán) 10% borjúsérumot (FBS: GIBCO BRL) és 500 mikrogramm/ml gentamicint tartalmazó MGM 448 tápfolyadékban tenyésztettünk 25 °C-on. TP055 rekombináns vírust állítottunk elő úgy, hogy a tenyésztett *Bombyx mori* sejtekbe például kalcium-foszfát koprecipitációs eljárással *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis vírusgén-DNS-t és pBm4–TP055 plazmid-DNS-t juttattunk.

Nevezetesen 2 mikrogramm vad típusú B6E vírus genomális DNS-t (Department of Insect Genetics and Breeding National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwasi, Tukuba, Ibaraki 305, Japán) és 10 mikrogramm pBm4–TP055 transzfer plazmid-DNS-t 240 mikroliter steril tisztított vízben oldottunk, az oldathoz azonos térfogatú 0,5 mol/l koncentrációjú CaCl₂-ot és 0,1 mol/l koncentrációjú HEPES-puffert adtunk, az elegyet elkevertük és 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az elegyhez 480 mikroliter 0,2 mol/l koncentrációjú NaCl-ot, 0,05 mol/l koncentrációjú HEPES-puffert, 0,75 mmol/l koncentrációjú NaH₂PO₄-ot és 0,75 mmol/l koncentrációjú Na₂HPO₄-ot adtunk, az elegyet néhány percig kevertük, majd 20–30 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk a genomális DNS-t, valamint a plazmidot tartalmazó kalcium-foszfát-gél kialakulásáig.

Ezután 960 mikroliter a vírus genomális DNS-t és a transzfer vektort tartalmazó kalcium-foszfát-gél szuszpenziót adtunk egy 25 cm² alapterületű T palackban (T25, Corning) 4 ml BoMo15AIIc sejthez, és az elegyet 12 órán át állni hagytuk. A tápfolyadékot friss (10% FBS-t és antibiotikumot tartalmazó) MGM448 tápfolyadékkal cseréltük ki, és a tenyésztést 25 °C-on folytattuk. A hatodik napon a vírust tartalmazó tápfolyadékot összegyűjtöttük.

A tápfolyadékot ülepítettük, hogy tiszta felülúszót kapjunk, amelyet ezután hígítottunk és mikrolemezen tenyésztett BoMo15AIIc sejtekhez adtunk, majd 8 nap elteltével (véghígításos eljárással) kiválogattuk azokat a rekeszeket, melyek olyan tápfolyadékot tartalmaztak, amelyekben mikroszkóppal vírusfertőzést figyeltünk meg, de polihedron testek nem képződtek. A tápfolyadékot összegyűjtöttük. A vírust tartalmazó oldatban nem figyeltünk meg vad típusú vírusszennyeződést.

Az így előállított, megakariocita érési faktort kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns vírust TP055–BmNPV-nek neveztük.

(3) A rekombináns gén expressziójának vizsgálata

Körülbelül 1×10^6 BoMo15AIIc sejtet 2 napon át egy 25 cm² alapterületű palack alján 4 ml 10% FBS-t tartalmazó MGM448 tápfolyadékban tenyésztettünk. A tenyészetet 0,5 fertőzési hányados mennyiségben vad típusú B6E vírus vagy megakariocita érési faktort kódoló gént tartalmazó rekombináns vírus (TP055–BmVPV) hozzáadásával fertőztük, ezután a BoMo15A IIc sejteket, valamint a fertőzött sejteket 3 napon át 25 °C-on tenyésztettük és Isogen készlet (Wako Pure Chemical) felhasználásával belőlük teljes RNS-t extraháltunk. Hasonlóképpen, a nem fertőzött BoMo15AIIc sejtekből is teljes RNS-t extraháltunk.

Ezután 1 mg ily módon extrahált RNS különböző méretű szálait agaróz-gélelektroforézissel szétválasztottuk, és a szétválasztott RNS-t kapillaritáson alapuló eljárással Zetaprobe szűrőre vittük át. A szűrőt digoxigeninnel (Boehringer Mannheim) jelölt megakariocita érési faktor cDNS-t (a 2. 1 példában ismertetett KY100, valamint NI065 oligomerekkel applifikált, PCR-terméket) (TP055 DNS-próba) tartalmazó hibridizációs pufferrel itattuk át, és az elegyet a rekombináns megakariocita érési faktor mRNS és a TP055 DNS-próba közti specifikus komplex kialakulása céljából 12 órán át 42 °C-on inkubáltuk. A komplexet alkalikus foszfatázzal konjugált antidigoxigenin ellenanyaggal (Boehringer Mannheim) reagáltattuk, és a megakariocita érési faktor-mRNS komplexet Lumigen PPD (AMPPD) (Boehringer Mannheim) hidrolízisekor keletkező kemilumineszcencia alapján határoztuk meg alkalikus foszfatázzal a gyártó utasításai szerint.

Amint azt az 1. ábra mutatja, a TP055–BmNPV-vel fertőzött sejtekből extrahált teljes RNS-frakcióban megakariocita érési faktor mRNS-t tudunk kimutatni, és igazoltuk, hogy az mRNS a TP055–BmNPV-vel fertőzött sejtekben expresszálódott. A B6E vírussal fertőzött sejtekben és a nem fertőzött sejtekben azonban DNS-próbával hibridizáló mRNS expresszálódása nem volt megfigyelhető.

(4) Rekombináns vírust tartalmazó oldat előállítása

Körülbelül 1×10^6 BoMo15AIIc sejtet 2 napon át egy 25 cm² alapterületű palack alján 4 ml 10% FBS-t tartalmazó MGM448 tápfolyadékban tenyésztettünk, és ehhez a tenyészethez 10 mikroliter a fenti fejezet (2) pontja szerint klónozott rekombináns vírust tartalmazó BoMo15AIIc sejtenyészet tápfolyadékát adtuk. Miután a tenyészetet 14 napig 25 °C-on tartottuk, a tápfolyadékot 5 percig 1000 rpm-en ülepítettük, így rekombináns vírusokat tartalmazó felülúszót kaptunk.

(5) *Bombyx mori* hemolympha készítése

A fenti fejezetben (3) kapott rekombináns vírus-szuszpenzió 10^{-1} hígításából, vagy a vad típusú B6E vírus 10^{-1} hígításából egyenként 50 mikroliter vírus szuszpenziót oltottunk 5. lárvállapotú *Bombyx mori* lárvákba, a selyemhernyókat 4–5 napig a kereskedelem-ben rendelkezésre álló mesterséges táplálékkal (Morus; Katakura Kogyo) tápláltuk 25 °C-on. 50 selyemhernyó hasát felvagtuk, a vérnyirkot, valamint a középbél tartalmát tartalmazó kivonatot jégén lehűtött műanyag csőbe töltöttük, és ülepítettük, hogy felülúszót kapjunk.

(6) A megakariocita érési faktor aktivitásának igazolása

A fenti fejezetben kapott (5) selyemhernyók nyert 50 ml vérnyirkát 20 mmol/l Tris/HCl (pH 7,4) pufferrel szemben alaposan dializáltunk, és egy azonos összetételű pufferrel ekvibrált Matrex Blue A oszlopra (2,5 × 15 cm) vittünk. Az oszlopot a nem kötődött frakció eltávolítása céljából azonos összetételű pufferrel alaposan mostuk, és a kötődött proteint 0–0,1 mol/l NaCl-tartalmú koncentrációgradienssel eluáltuk. Összehasonlítottuk a rekombináns vírussal oltott és a vad típusú vírussal oltott selyemhernyók vérnyirkának megakariocita érésifaktor-aktivitást jelző elúciós profilját.

Amint azt a 12. ábra mutatja, a rekombináns vírussal oltott selyemhernyók hemolymphájának megakariocita érésifaktor-aktivitása lényegesen magasabb volt a vad típusú vírussal oltottakénál.

A 4. példa szerint pBm4 *Bombyx mori* baculovírus transzfer vektort, PbE *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis vírust, valamint BoMo15AIIc *Bombyx mori* sejteket használtunk a találmány szerinti megoldáshoz, azonban a találmány nem korlátozódik ezek használatára. Nevezetesen, a gyakorlatban járatos személy egyéb baculovírus transzfervektorokat (például pBK283, pBKblue, beszerezhető a Funakoshi cégtől) egyéb *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis vírust (például a Funakoshi cégtől rendelhető tisztított DNS-t), valamint egyéb *Bombyx mori* sejteket (például a Funakoshi cégtől rendelhető BmN4 sejteket) is alkalmazhat megakariocita érési faktor előállítására.

A találmány szerinti megakariocita érési faktor IL–3 jelenlétében meggyorsítja mieloid sejtekből a megakariociták kialakulását. A találmány szerinti megakariocita érési faktor fontos szerepet játszik a megakariociták differenciálódásában, és in vivo thrombopoetinként hat. A találmány szerinti megakariocita érési faktor hatásos gyógyászati készítmény lehet nemcsak a vérlemezék számának csökkenésével járó különböző megbetegedésekben, hanem csontvelő-átültetésekor alkalmazott besugárzást vagy rákos megbetegedések kemoterápiáját követően a csökkenő vérlemezkeszám szabályozására.

SZEKVENCIALISTA

Információk az 1. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: aminosav
- (B) Hossz: 9
- (C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása: 1. szekvencia:

Xxx Glu Thr Ile Asn Xxx His Phe Lys
1 5 9

Információk a 2. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: aminosav
- (B) Hossz: 7
- (C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása: 2. szekvencia:

Xxx Gln Xxx Ala Phe Thr Lys
1 5 7

Információk a 3. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: aminosav

(B) Hossz: 19

(C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása:

3. szekvencia:

Val Glu Xxx Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Xxx Xxx Asn
1 5 10 15
Ile Asn Lys
19

Információk a 4. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: aminosav

(B) Hossz: 17

(C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása:

4. szekvencia:

Xxx Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Xxx Ala
1 5 10 15
Ala Xxx Gly
17

Információk az 5. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: aminosav

(B) Hossz: 9

(C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása: 5. szekvencia:

Xxx Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys
1 5 9

Információk a 6. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: aminosav

(B) Hossz: 20

(C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása:

6. szekvencia:

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg
1 5 10 15
Met Xxx Gly Lys
20

Információk a 7. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: aminosav

(B) Hossz: 5

(C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása: 7. szekvencia:

Leu Tyr Asp Ala Lys

1 5

Információk a 8. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: aminosav

(B) Hossz: 5

(C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása: 8. szekvencia:

Asn Tyr Glu Met Lys

1 5

Információk a 9. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: aminosav

(B) Hossz: 10

(C) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: peptid

(iii) Szekvencia leírása: 9. szekvencia:

Ala Val Ala Met Met His Gln Xxx Arg Lys

1 5 10

Információk a 10. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: nukleinsav

(B) Hossz: 38

(C) Topológia: lineáris

(D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Tulajdonságok: a 3. szekvencia szerinti aminosavszekvenciának felel meg; I jelentése inozin.

(iv) Szekvencia leírása:

10. szekvencia:

GTIGARIIG TIGAYTTYAC IAA YCAYTI GARGAYAC 38

Információk a 11. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Típus: nukleinsav

(B) Hossz: 32

(C) Topológia: lineáris

(D) Szálszám: egyszeres

- (ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
 (iii) Tulajdonságok: a 4. szekvencia szerinti aminosavszekvenciának felel meg; I jelentése inozin.
 (iv) Szekvencia leírása: 11. szekvencia:

TACATCGAIG TIACIGARGA RGGIACNGAR GC 32

Információk a 12. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 37
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

10

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Tulajdonságok: 3'-RACE kit-hez (Gibco BRL) kapcsolt oligomerszekvencia

(iv) Szekvencia leírása:
 12. szekvencia:

GGCCACGCGT CGACTAGTAC TTTTTTTTTT TTTTTT 34

Információk a 13. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 20
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

20

(C) Topológia: lineáris

(D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Szekvencia leírása: 16. szekvencia:

CTCAGGCAGC AGAACGTACA T 21

Információk a 17. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 21
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Szekvencia leírása: 13. szekvencia:

ATGTTGTGGG GACTGCTATA 20

25

Információk a 14. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 23
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

30

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Szekvencia leírása: 17. szekvencia:

GGCGACGACT CCTGGAGCCC G 21

Információk a 18. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 22
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Szekvencia leírása: 14. szekvencia:

CAAGGCGAAT GACCTCTAAG TAT 23

35

Információk a 15. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 21
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

40

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Szekvencia leírása: 18. szekvencia:

GACACCAGAC CAACTGGTAA TG 22

Információk a 19. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 36
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Szekvencia leírása: 15. szekvencia:

CCCCGAAGCA ATCCCAGAGA G 21

45

Információk a 16. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 21

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Szekvencia leírása: 19. szekvencia:

CATCCGGGAG ATGTACAGCC GGCCGCCAGA GGCAAT 36

Információk a 20. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 21
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

55

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
 (B) Hossz: 24
 (C) Topológia: lineáris
 (D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Szekvencia leírása: 20. szekvencia:

GCTGTGGCCA TGATGCACCA G 21

60

Információk a 22. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 51
(C) Topológia: lineáris

- (D) Szálszám: egyszeres
(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
(iii) Szekvencia leírása: 22. szekvencia:

CATCCGGGAG ATGTACAGCC GGCCGCCAGA GGCAATGCCA GACAGGTCAG C 51

Információk a 23. szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
(A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 17
(C) Topológia: lineáris
(D) Szálszám: egyszeres
(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
(iii) Szekvencia leírása: 23. szekvencia:
GTTTTCCAG TCACGAC 17

Információk a 24. szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
(A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 17
(C) Topológia: lineáris
(D) Szálszám: egyszeres
(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
(iii) Szekvencia leírása: 24. szekvencia:
CAGGAAACAG CTATGAC 17

Információk a 25. szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
(A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 20
(C) Topológia: lineáris
(D) Szálszám: egyszeres
(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
(iii) Szekvencia leírása: 25. szekvencia:
AATTATGGCC CACACCAGTG 20

Információk a 26. szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
(A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 20
(C) Topológia: lineáris
(D) Szálszám: egyszeres
(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
(iii) Szekvencia leírása: 26. szekvencia:
ACTAGCCGCT ACAGTCAACA 20

Információk a 27. szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
(A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 21
(C) Topológia: lineáris
(D) Szálszám: egyszeres
(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
(iii) Szekvencia leírása: 27. szekvencia:
TTGCCACTTG CCTTTGAAGT A 21

Információk a 28. szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
(A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 21
(C) Topológia: lineáris
(D) Szálszám: egyszeres
(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
(iii) Szekvencia leírása: 28. szekvencia:
CTGATGCATC ATGGCGACTG C 21

Információk a 29. szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
(A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 21
(C) Topológia: lineáris
(D) Szálszám: egyszeres
(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS
(iii) Szekvencia leírása: 29. szekvencia:
AGCATTCACC AGCACCATTA C 21

Információk a 30. szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
(A) Típus: nukleinsav
(B) Hossz: 1950
(C) Topológia: lineáris
(D) Szálszám: kétszeres
(ii) Molekula típusa: cDNS
(iii) Eredeti forrás: humán
(iv) Közvetlen forrás: A431
(v) Tulajdonságok: humán megakariocita érési fak-
tort kódoló DNS

(vi) Szekvencia leírása: 30. szekvencia:

GGCACGAGAG GAACTGAAGC CCAGCTGTGA AGGCCGCAGA CTGCAGTGAG 50

AGGAGGCTGC ACTCCATTTT GCA ATG GCC TCC CTT GCT GCA GCA AAT 97

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn

1

5

GCA GAG TTT TGC TTC AAC CTG TTC AGA GAG ATG GAT GAC AAT CAA 142

Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln

10

15

20

GGA AAT GGA AAT GTG TTC TTT TCC TCT CTG AGC CTC TTC GCT GCC 187

Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala

25

30

35

CTG GCC CTG GTC CGC TTG GGC GCT CAA GAT GAC TCC CTC TCT CAG 232

Leu	Ala	Leu	Val	Arg	Leu	Gly	Ala	Gln	Asp	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln			
40						45					50						
ATT	GAT	AAG	TTG	CTT	CAT	GTT	AAC	ACT	GCC	TCA	GGA	TAT	GGA	AAC	277		
Ile	Asp	Lys	Leu	Leu	His	Val	Asn	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Gly	Asn			
55						60					65						
TCT	TCT	AAT	AGT	CAG	TCA	GGG	CTC	CAG	TCT	CAA	CTG	AAA	AGA	GTT	322		
Ser	Ser	Asn	Ser	Gln	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Lys	Arg	Val			
70						75					80						
TTT	TCT	GAT	ATA	AAT	GCA	TCC	CAC	AAG	GAT	TAT	GAT	CTC	AGC	ATT	367		
Phe	Ser	Asp	Ile	Asn	Ala	Ser	His	Lys	Asp	Tyr	Asp	Leu	Ser	Ile			
85						90					95						
GTG	AAT	GGG	CTT	TTT	GCT	GAA	AAA	GTG	TAT	GGC	TTT	CAT	AAG	GAC	412		
Val	Asn	Gly	Leu	Phe	Ala	Glu	Lys	Val	Tyr	Gly	Phe	His	Lys	Asp			
100						105					110						
TAC	ATT	GAG	TGT	GCC	GAA	AAA	TTA	TAC	GAT	GCC	AAA	GTG	GAG	CGA	457		
Tyr	Ile	Glu	Cys	Ala	Glu	Lys	Leu	Tyr	Asp	Ala	Lys	Val	Glu	Arg			
115						120					125						
GTT	GAC	TTT	ACG	AAT	CAT	TTA	GAA	GAC	ACT	AGA	CGT	AAT	ATT	AAT	502		
Val	Asp	Phe	Thr	Asn	His	Leu	Glu	Asp	Thr	Arg	Arg	Asn	Ile	Asn			
130						135					140						
AAG	TGG	GTT	GAA	AAT	GAA	ACA	CAT	GGC	AAA	ATC	AAG	AAC	GTG	ATT	547		
Lys	Trp	Val	Glu	Asn	Glu	Thr	His	Gly	Lys	Ile	Lys	Asn	Val	Ile			
145						150					155						
GGT	GAA	GGT	GGC	ATA	AGC	TCA	TCT	GCT	GTA	ATG	GTG	CTG	GTG	AAT	592		
Gly	Glu	Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Met	Val	Leu	Val	Asn			
160						165					170						
GCT	GTG	TAC	TTC	AAA	GGC	AAG	TGG	CAA	TCA	GCC	TTC	ACC	AAG	AGC	637		
Ala	Val	Tyr	Phe	Lys	Gly	Lys	Trp	Gln	Ser	Ala	Phe	Thr	Lys	Ser			
175						180					185						
GAA	ACC	ATA	AAT	TGC	CAT	TTC	AAA	TCT	CCC	AAG	TGC	TCT	GGG	AAG	682		
Glu	Thr	Ile	Asn	Cys	His	Phe	Lys	Ser	Pro	Lys	Cys	Ser	Gly	Lys			
190						195					200						
GCA	GTC	GCC	ATG	ATG	CAT	CAG	GAA	CGG	AAG	TTC	AAT	TTG	TCT	GTT	727		
Ala	Val	Ala	Met	Met	His	Gln	Glu	Arg	Lys	Phe	Asn	Leu	Ser	Val			
205						210					215						
ATT	GAG	GAC	CCA	TCA	ATG	AAG	ATT	CTT	GAG	CTC	AGA	TAC	AAT	GGT	772		
Ile	Glu	Asp	Pro	Ser	Met	Lys	Ile	Leu	Glu	Leu	Arg	Tyr	Asn	Gly			
220						225					230						
GGC	ATA	AAC	ATG	TAC	GTT	CTG	CTG	CCT	GAG	AAT	GAC	CTC	TCT	GAA	817		
Gly	Ile	Asn	Met	Tyr	Val	Leu	Leu	Pro	Glu	Asn	Asp	Leu	Ser	Glu			
235						240					245						
ATT	GAA	AAC	AAA	CTG	ACC	TTT	CAG	AAT	CTA	ATG	GAA	TGG	ACC	AAT	862		

Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn	
250	255 260
CCA AGG CGA ATG ACC TCT AAG TAT GTT GAG GTA TTT TTT CCT CAG	907
Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val Glu Val Phe Phe Pro Gln	
265	270 275
TTC AAG ATA GAG AAG AAT TAT GAA ATG AAA CAA TAT TTG AGA GCC	952
Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys Gln Tyr Leu Arg Ala	
280	285 290
CTA GGG CTG AAA GAT ATC TTT GAT GAA TCC AAA GCA GAT CTC TCT	997
Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys Ala Asp Leu Ser	
295	300 305
GGG ATT GCT TCG GGG GGT CGT CTG TAT ATA TCA AGG ATG ATG CAC	1042
Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg Met Met His	
310	315 320
AAA TCT TAC ATA GAG GTC ACT GAG GAG GGC ACC GAG GCT ACT GCT	1087
Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Thr Ala	
325	330 335
GCC ACA GGA AGT AAT ATT GTA GAA AAG CAA CTC CCT CAG TCC ACG	1132
Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser Thr	
340	345 350
CTG TTT AGA GCT GAC CAC CCA TTC CTA TTT GTT ATC AGG AAG GAT	1177
Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp	
355	360 365
GAC ATC ATC TTA TTC AGT GGC AAA GTT TCT TGC CCT TGA	1216
Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro ...	
370	375 380
AAATCCAATT GGTTCCTGTT ATAGCAGTCC CCACAACATC AAAGAACCAC	1266
CACAAGTCAA TAGATTTGAG TTTAATTGGA AAAATGTGGT GTTTCCTTTG	1316
AGTTTATTTT TCCTAACAT TGGTCAGCAG ATGACACTGG TGACTTGACC	1366
CTTCCTAGAC ACCTGGTTGA TTGTCTGAT CCCTGCTCTT AGCATTCTAC	1416
CACCATGTGT CTCACCCATT TCTAATTTCA TTGTCTTTCT TCCCACGCTC	1466
ATTTCTATCA TTCTCCCCCA TGACCCGTCT GGAAATTATG GAGAGTGCTC	1516
AACTGGTAAG GAGAACGTAG AAGTAGCCCT AGGGATCCTT TTTGAAACTC	1566
TACAGTTATC GCAGATATTC TAGCTTCATT GTAAGCAATC TAGGAAATAA	1616
GCCCTGCTGC TTTCTAGAAA TAAGTGTGAA GGATAAATTT TCTTTGTTGA	1666
CCTATGAAGA TTTTAGAGTT TACCTTCATA TGTTTGATTT TAAATCAGTG	1716
TATAATCTAG ATGGTAAAA ATGTGAAATT GGGATTAGGG ACCAACCAAA	1766
ATATTTTCAAT AATGCTTTCA ATTGACAAAT TTTGGTCTTT CTTTGATAAG	1816
ACAATATGTA CATAGTTTTT TCAAATATTA AAGATCTTTT AACTGTTGGC	1866
AGTTGTTATC TACAGAATCA TATCTCATAT GCTGTGTAGT TTATAAGTTT	1916
TTTCTCTATT TATCAGAATA AAGAAATACA ACAT	1950

Információk a 31. szekvenciához:

(i) Szekvencajellemzők:

(A) Típus: nukleinsav

(B) Hossz: 20

(C) Topológia: lineáris

(D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(iii) Eredeti forrás: humán

(iv) Tulajdonságok: 5'-nem transzlálódó régió

(v) Szekvenca leírása: 31. szekvenca:

5

10

CTCGAATTTCG CGATGGCCTC CCTTGCTGCA GCAAATG 37

Információk a 33. szekvenciához:

(i) Szekvencajellemzők:

(A) Típus: nukleinsav

(B) Hossz: 49

15

AACTGAAGCC CAGCTGTGAA 20

Információk a 32. szekvenciához:

(i) Szekvencajellemzők:

(A) Típus: nukleinsav

(B) Hossz: 37

(C) Topológia: lineáris

(D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(vi) Szekvenca leírása:

32. szekvenca:

(C) Topológia: lineáris

(D) Szálszám: egyszeres

(ii) Molekula típusa: szintetikus DNS

(vi) Szekvenca leírása: 33. szekvenca:

GGGAATTTCG GGGCGCGTGG TGGTTCTTTG ATGTTGTGGG GACTGCTAT 49

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy a következő sajátosságokkal rendelkezik:

(1) stimulálja a megakariociták differenciálódását;

(2) gélzsúréssel és SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) megállapított molekulatömege 55–57 kilodalton, és intermolekuláris diszulfidhidakat nem tartalmaz;

(3) izoelektromos pontja $6,5 \pm 0,5$;

(4) tartalmazza a szekvencialista szerinti 1–9. aminosavszekvenciák legalább egyikét.

2. Az 1. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy humán sejtekben termelődött.

3. A 2. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy rákos humán sejtekben termelődött.

4. A 3. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy A431 humán epidermoid karcinómasejt eredetű sejtekben termelődött.

5. A 4. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy proteinmentes tápfolyadékban tenyésztett A431 humán epidermoid karcinómasejt eredetű sejtekben termelődött.

6. Az 1. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy alapvetően a 30. szekvenca szerinti aminosavszekvenciával rendelkezik.

7. Az 1. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy a 30. aminosavszekvenciával rendelkezik, egy vagy több alábbi módosítással

(a) a 30. aminosavszekvenca szerinti 1–30. aminosavmaradék deletált,

(b) a 30. aminosavszekvenca szerinti 1–10. aminosavmaradék más aminosavmaradékkal van kicserélve,

(c) a 30. aminosavszekvenciához egy vagy több aminosavmaradék van hozzáadva.

25 8. Az 1. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy génrekombináns eljárással transzformált sejtek tenyészetéből az 1–9. aminosavszekvenciák legalább egyikét kódoló polinukleotiddal hibridizáló polinukleotid felhasználásával állítható elő.

30 9. Az 1. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy az 1–9. aminosavszekvenciák legalább egyikét tartalmazza.

35 10. A 6–9. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy glikozilezett.

11. A 6–9. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy a faktor N-terminális része biokémiai vagy vegyi eljárással módosított.

40 12. A 11. igénypont szerinti megakariocita érési faktor, *azzal jellemezve*, hogy a faktor N-terminális részén az első metionin deletált és a második alanin acetilezett.

45 13. Izolált DNS, *azzal jellemezve*, hogy az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktort kódolja.

14. Expressziós vektor, *azzal jellemezve*, hogy a 13. igénypont szerinti DNS-t tartalmazza.

50 15. Gazdasejt, *azzal jellemezve*, hogy a 14. igénypont szerinti expressziós vektorral van transzformálva.

16. Gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktort és egy, a gyógyszergyártásban szokásos hordozóanyagot tartalmaz.

55 17. A 16. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy trombocitopénia kezelésére szolgál.

60 18. Ellenanyag, *azzal jellemezve*, hogy az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktor ellen termelődött.

19. Eljárás az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 15. igénypont szerinti gazdasejtet tenyésztünk, és a megakariocita érési faktort a tenyészléből kinyerjük.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy gazdaszervezetként *Bombyx mori* selyemhernyót használunk.

21. Izolált DNS, *azzal jellemezve*, hogy a 6–12. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktort kódolja.

22. Expressziós vektor, *azzal jellemezve*, hogy a 21. igénypont szerinti DNS-t tartalmazza.

23. Gazdasejt, *azzal jellemezve*, hogy a 22. igénypont szerinti expressziós vektorral van transzformálva.

24. Gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 6–12. igénypontok bármelyike szerinti mega-

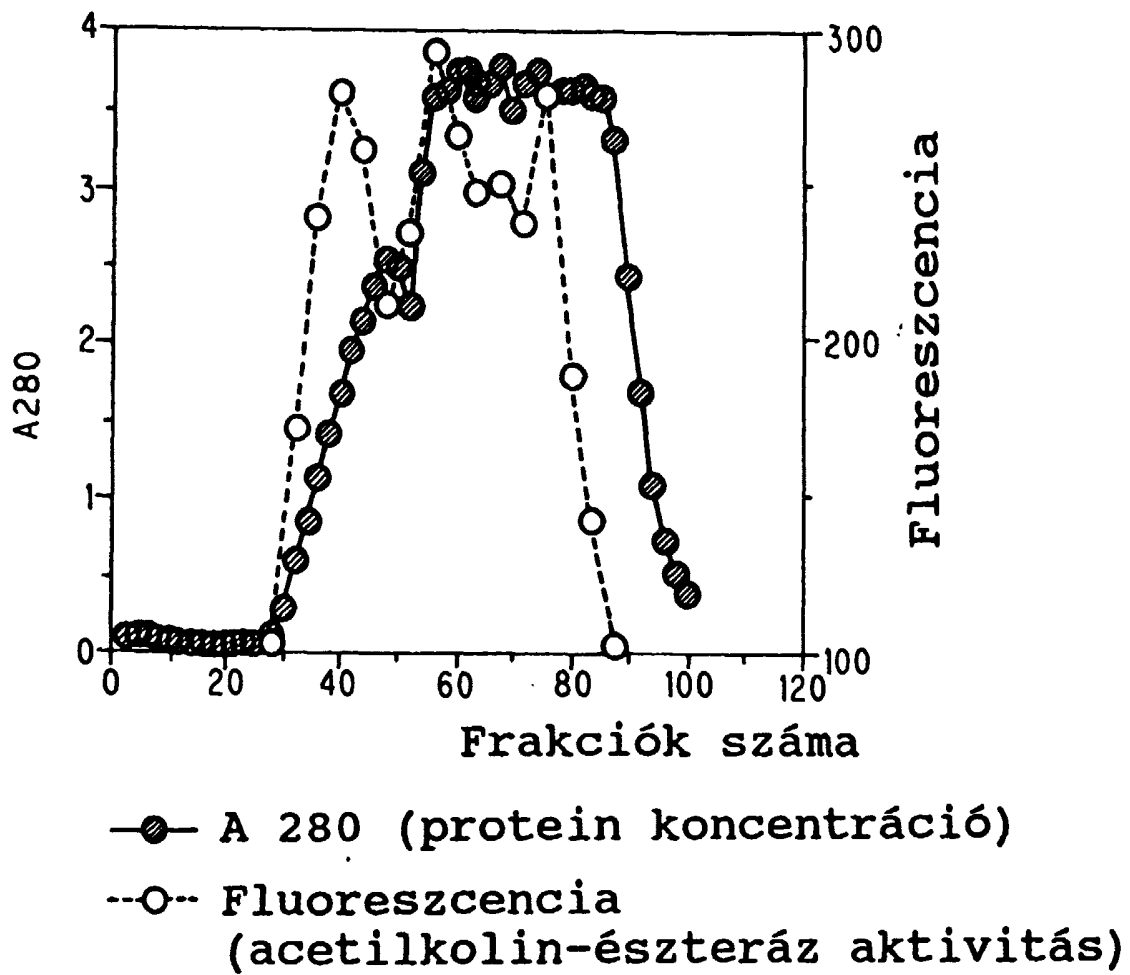
kariocita érési faktort és egy, a gyógyszergyártásban szokásos hordozóanyagot tartalmaz.

25. A 24. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy trombocitopénia kezelésére szolgál.

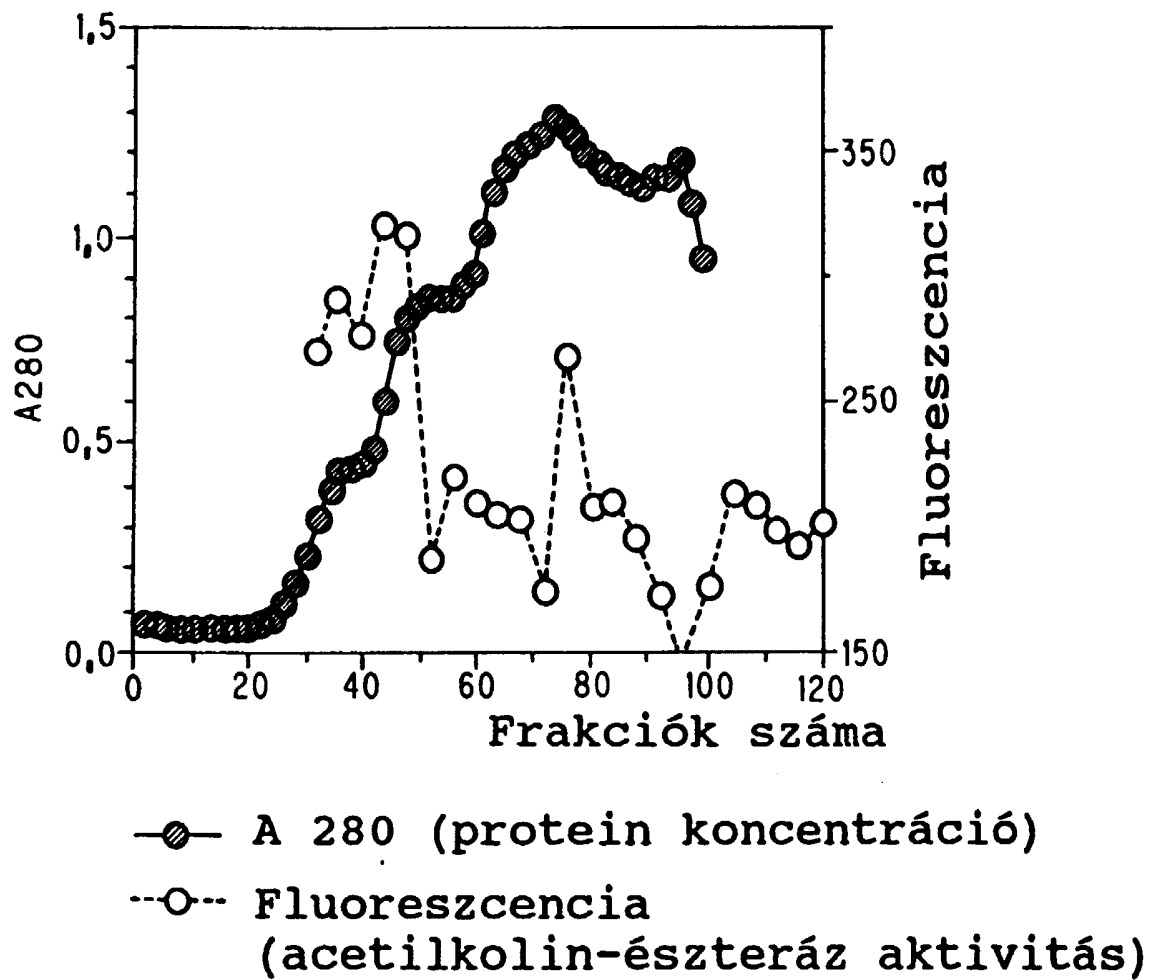
26. Ellenanyag, *azzal jellemezve*, hogy a 6–12. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktor ellen termelődött.

27. Eljárás a 6–12. igénypontok bármelyike szerinti megakariocita érési faktor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 23. igénypont szerinti gazdasejtet tenyésztünk, és a megakariocita érési faktort a tenyészléből kinyerjük.

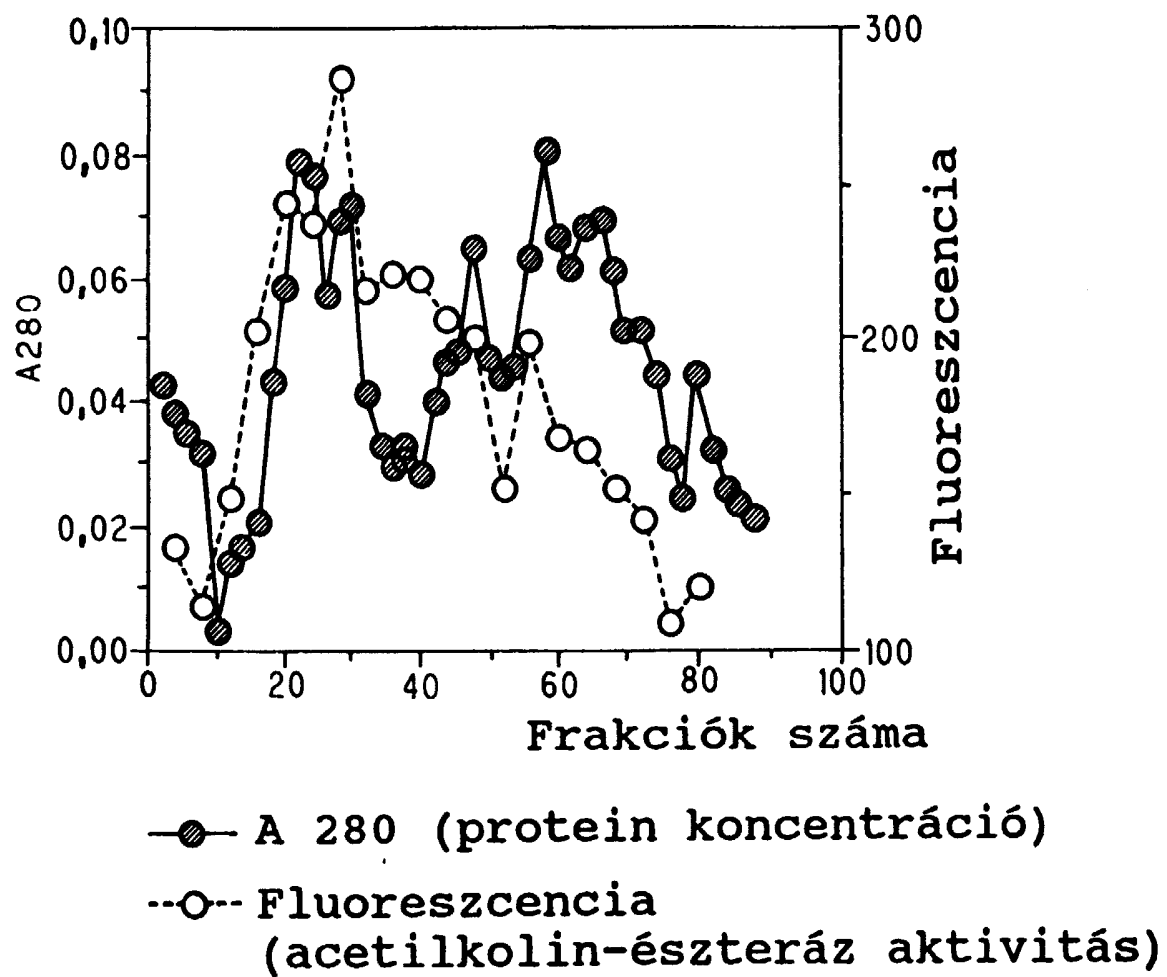
28. A 27. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy gazdaszervezetként *Bombyx mori* selyemhernyót használunk.



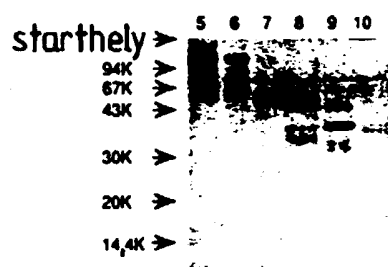
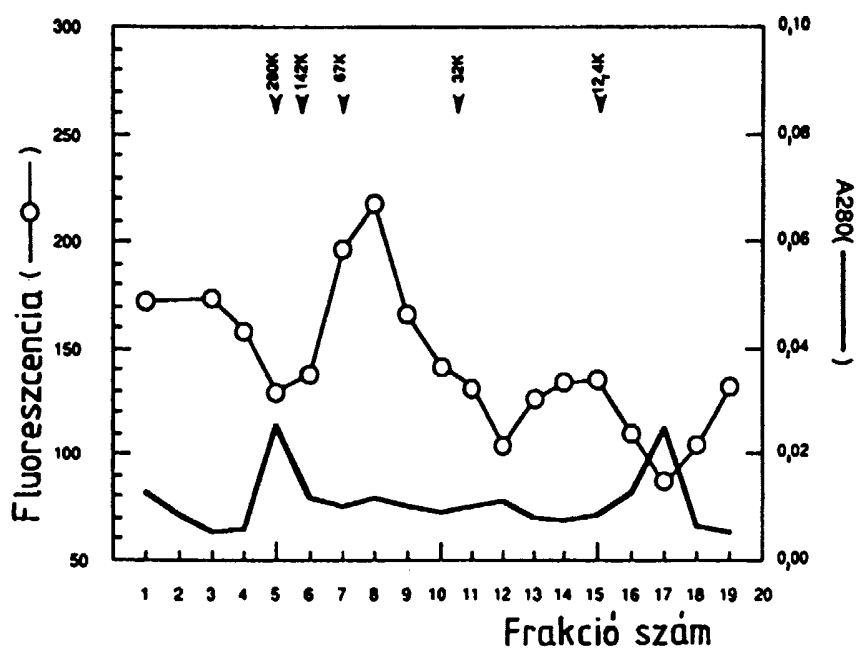
1. ábra



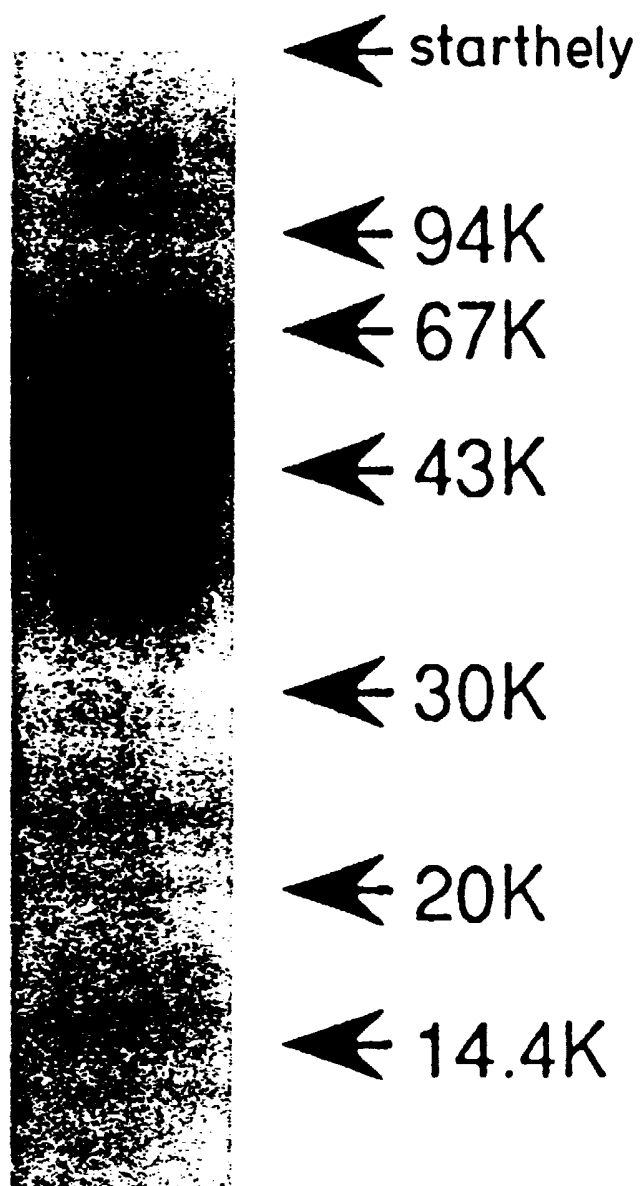
2. ábra



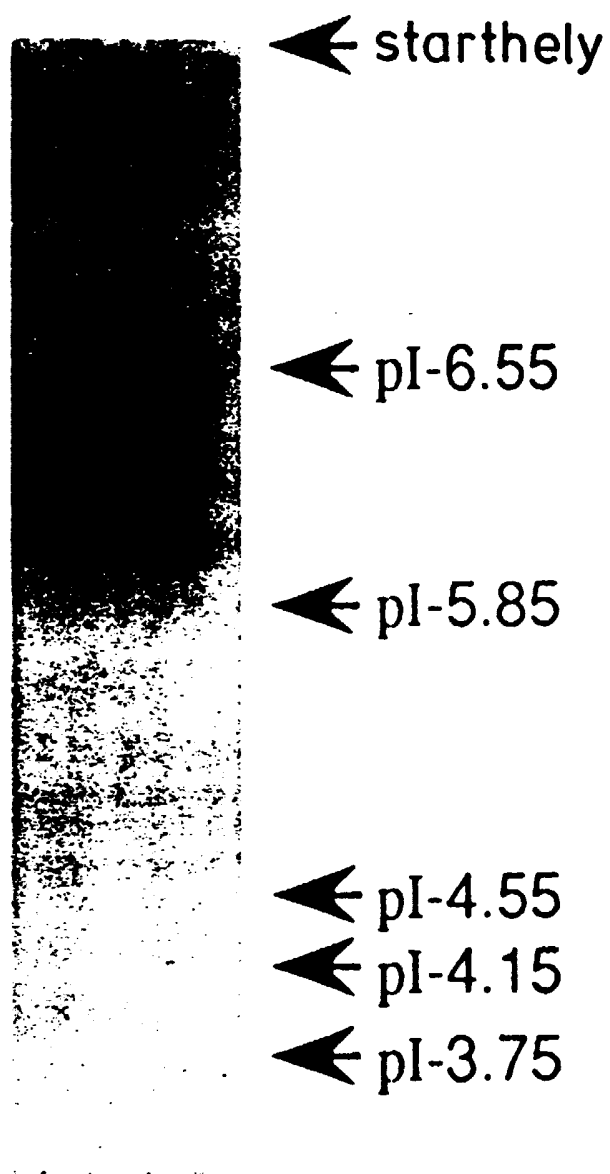
3. ábra



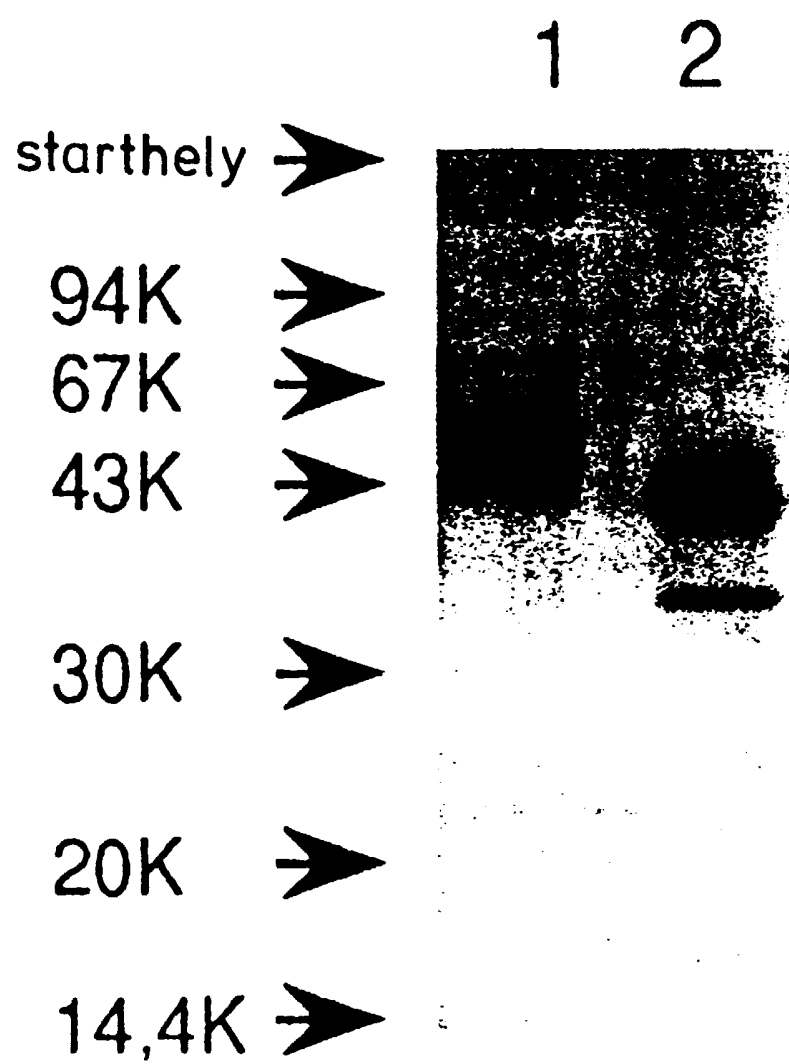
4. ábra



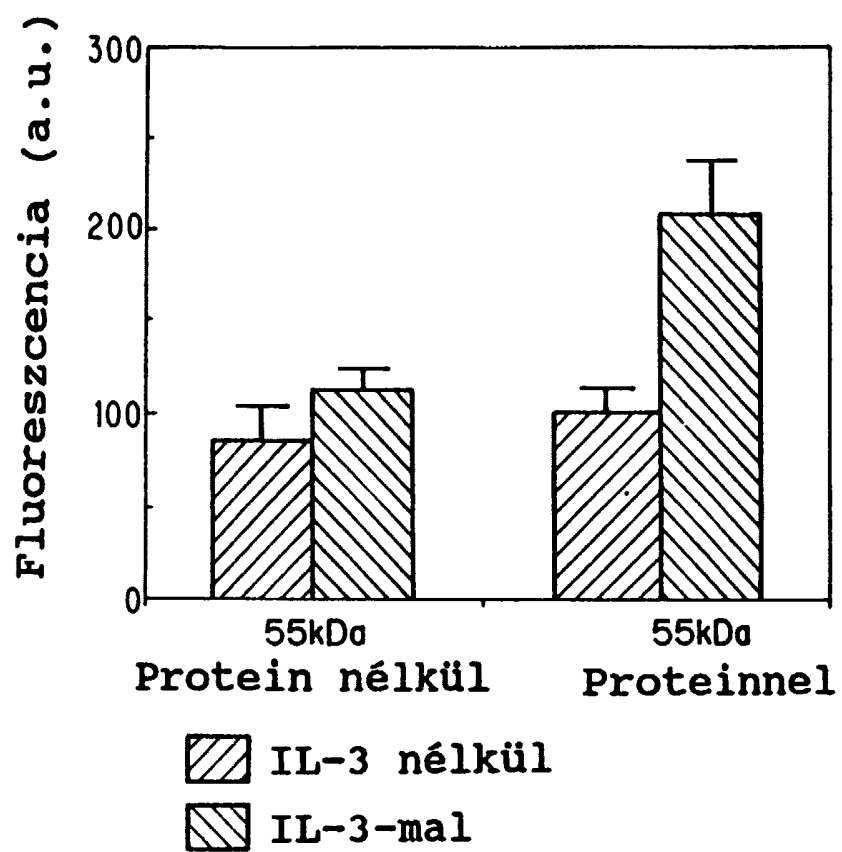
5. ábra



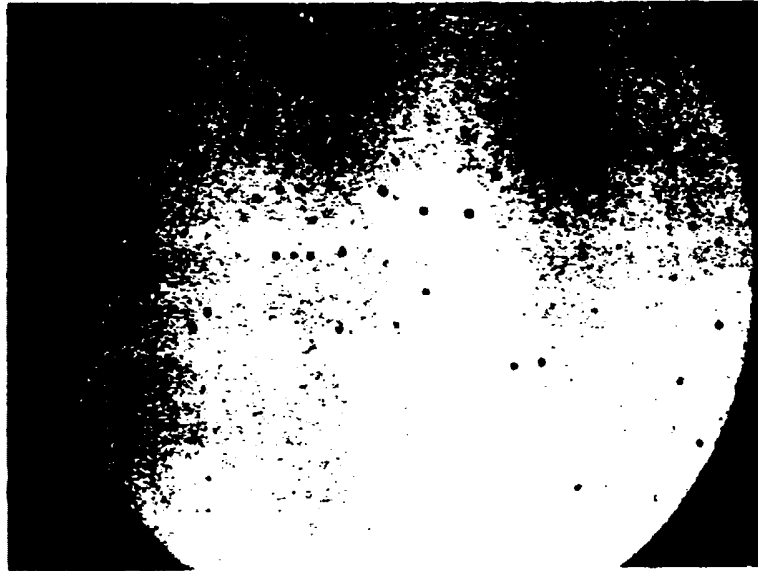
6. ábra



7. ábra



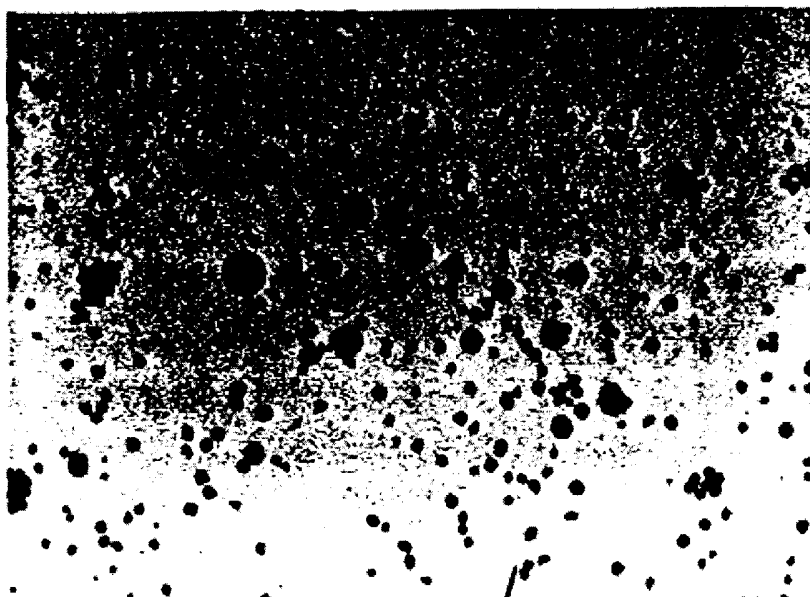
8. ábra



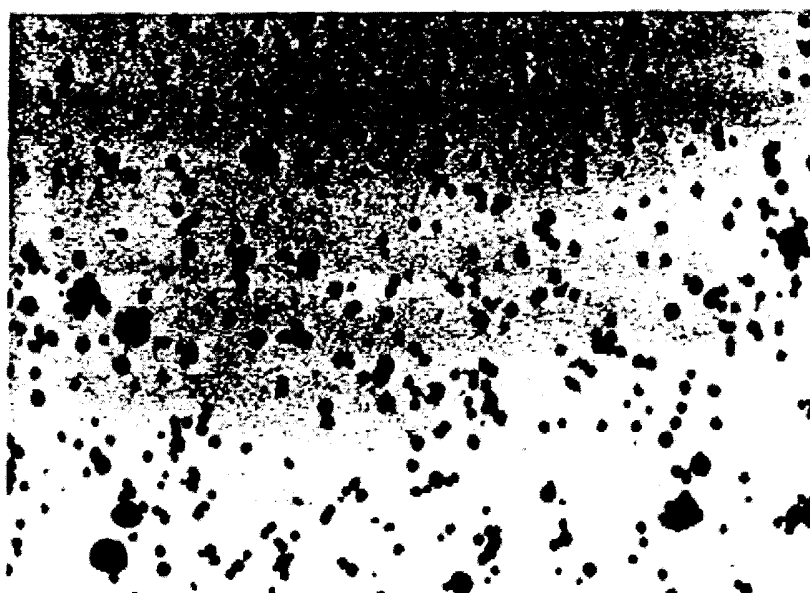
9B. ábra



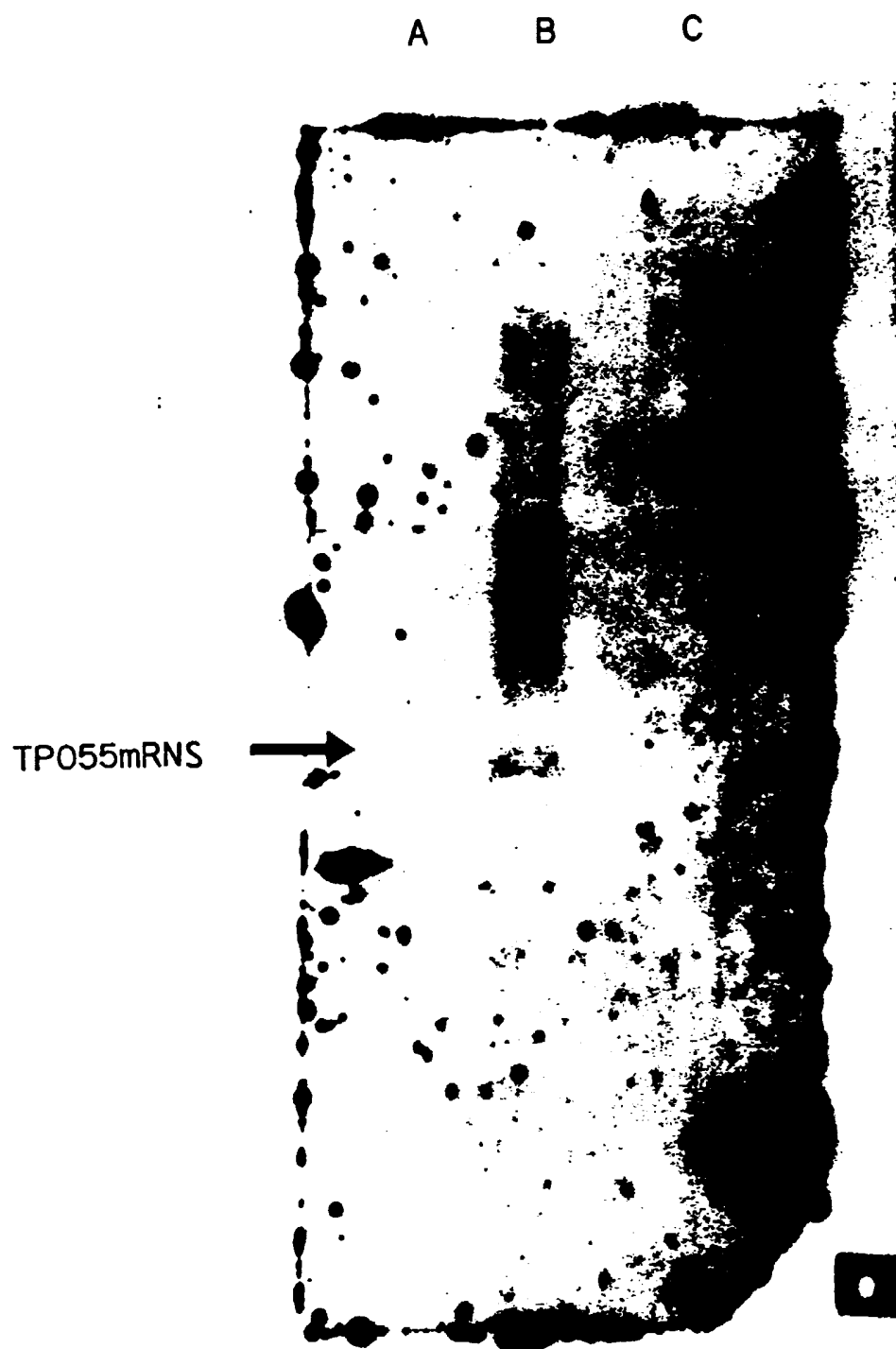
9A. ábra



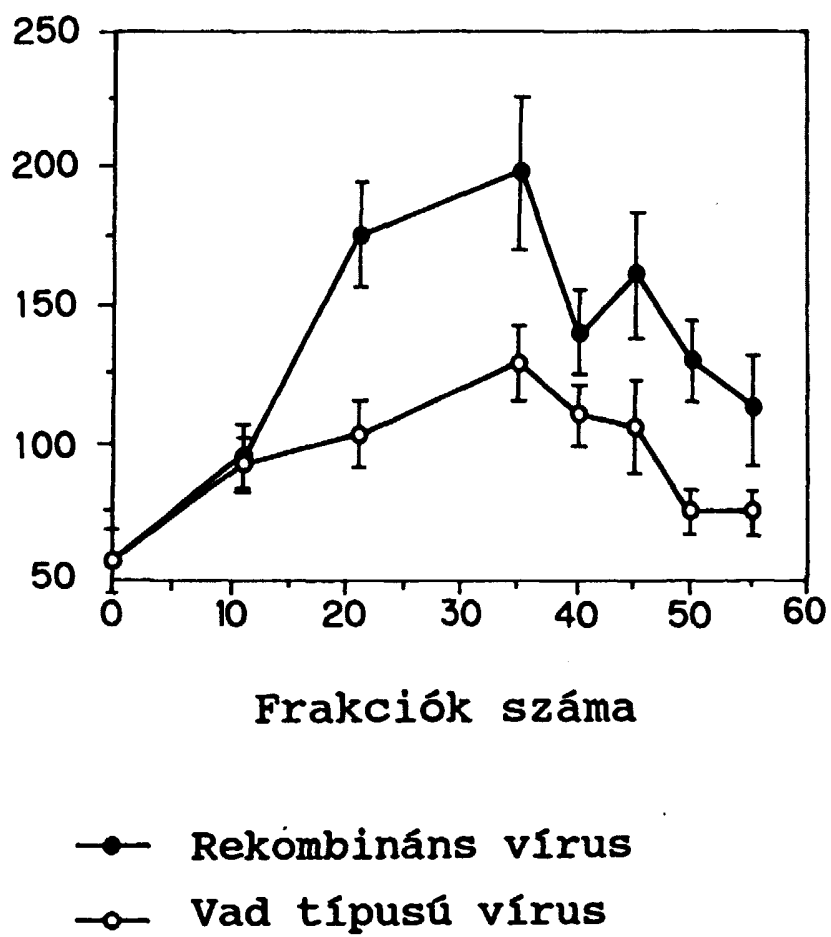
10B. ábra



10A. ábra



11. ábra



12. ábra