

K I V O N A T

Szekvencia-specifikus DNS-rekombináció eukarióta sejtekben

A találmány tárgya egy eljárás DNS szekvencia-specifikus rekombinálására egy eukarióta sejtben, amely eljárás magában foglalja egy első DNS-szekvencia bejuttatását egy sejtbe, egy második DNS-szekvencia bejuttatását ugyanazon sejtbe, majd egy szekvencia-specifikus rekombináció végrehajtását a λ -bakteriofág Int integrázával. Az eljárás egy előnyös megvalósításában a DNS szekvencia-specifikus rekombinálását az Int enzimmal és egy Xis faktorral hajtjuk végre. A találmány tárgyához tartoznak továbbá az említett DNS-szekvenciákat tartalmazó vektorok és azok génterápiás gyógyszerként való alkalmazása a humán és állatgyógyászatban.

Tervez.

Szekvencia-specifikus DNS-rekombináció eukarióta sejtekben

A találmány tárgya eljárás DNS szekvencia-specifikus rekombinálására eukarióta sejtekben, amely eljárás magában foglalja egy első DNS-szekvencia bejuttatását egy sejtbe, és egy szekvencia-specifikus rekombináció végrehajtását egy λ -bakteriofág Int integráza segítségével. Találmányunk egyik előnyös megvalósítása egy olyan eljárás, ahol a DNS szekvencia-specifikus rekombinálását egy Int és egy Xis faktor végzi. A találmány tárgyához tartoznak még vektorok és azok gyógyszerként való alkalmazása is.

Az eukarióta genomok ellenőrzött módosítása fontos módszer az egyes gének funkcióinak vizsgálatára élő szervezetekben, emellett az említett módosítás szerepet kaphat az orvoslás gén-terápiás eljárásai között is. Ebben a vonatkozásban különösen fontos a transzgén állatok létrehozása, a gének vagy génrészletek megváltoztatása (az úgynevezett „gén-megcélzás”), és az idegen DNS irányított beépítése a magasabbrendű eukarióták genomjába. Ezek a technológiák ma már javíthatók a szekvencia-specifikus rekombinációs rendszerek jellemzésével és alkalmazásával.

A hagyományos szekvencia-specifikus DNS-rekombinázok két családba sorolhatók. Az első család tagjai, az úgynevezett integrázok, a DNS-szálat két meghatározott nukleotid-szekvencia között vágják el és egyesítik újra; a továbbiakban ezeket a szekvenciákat nevezzük „rekombinációs szekvenciának”. A rekombinációs szekvenciák lehetnek két különálló vagy egy és ugyanazon DNS-molekulában, ami inter- vagy intramolekuláris rekombinációt eredményezhet. Az utóbbi esetben a reakció eredménye függ a re-

kombinációs szekvenciák egymáshoz képesti irányultságától. A fordított orientáció esetében a rekombinációs szekvenciák között elhelyezkedő DNS-szakasz átfordul (inverzió). A rekombinációs szekvenciák egyenes irányultságú, azaz „tandem” elhelyezkedése esetén kivágás (deléció) következik be. Az intermolekuláris rekombináció esetében, amikor a rekombinációs szekvenciák két különböző DNS-molekulán helyezkednek el, a két DNS-molekula fúziójára (egyesülésére) kerül sor. Amíg az integráz-család tagjai rendszerint mind az intra-, mind az intermolekuláris rekombinációt katalizálják, addig a másik család tagjai, az úgynevezett invertázok és rezolvázok csak az intramolekuláris rekombinációt képesek katalizálni.

Az eukarióta genomok módosítására jelenleg használt rekombinázorok az integráz-családba tartoznak. Az említett rekombinázorok a *P1* bakteriofág Cre rekombináza és az élesztő Flp rekombináza [Müller, *Mech. Develop.* 82, 3 (1999)]. A rekombinációs szekvenciákat, amelyekhez a Cre rekombinázor kötődik, *loxP*-nek nevezik. A *loxP* egy 34 bp hosszúságú nukleotid-szekvencia, amely két 13 bp hosszúságú, invertált nukleotid-szekvenciát és egy 8 bp hosszú spacer-t (elválasztó szakaszt) tartalmaz a két invertált nukleotid-szekvencia között [Hoess és munkatársai, *J. Mol. Biol.* 181, 351 (1985)]. Az Flp *FRT*-nek nevezett kötő szekvenciái hasonló felépítésűek, de különböznek a *loxP*-től [Kilby és munkatársai, *Trends Genet.* 9, 413 (1993)]. Így tehát a rekombinációs szekvenciák nem helyettesíthetők egymással, azaz a Cre nem képes rekombinálni az *FRT*-szekvenciákat és az FLP nem képes rekombinálni a *loxP*-szekvenciákat. Mindkét rekombinációs rendszer nagy távolsá-

gon át is hatásos, azaz képesek a két *loxP*- vagy *FRT*-szekvencia között elhelyezkedő DNS-szakasz invertálására vagy kivágására és a végek „szomszédosítására” (összezáras, flanking) még akkor is, ha az érintett szakasz több tízezer bp hosszúságú.

Az említett két rendszer segítségével létrehoztak már szövetspecifikus rekombinációt egy egér-rendszerben, kromoszómális transzlokációt növényekben és állatokban, valamint megoldották a génexpresszió szabályozott indukcióját (Müller, *id. közl.*). Ezen a módon távolították el a DNS-polimeráz- β enzimet egerek bizonyos szöveteiből [Gu és munkatársai, *Science* 265, 103 (1994)]. Egy további példa az SV-40 DNS tumorvírus onkogénjének specifikus aktiválása egerek szemlencséjében, ami kizárólag ebben a szövetben okozott tumort. Ezen túl a Cre-*loxP* stratégia az indukálható promoterekkel kapcsolatban is használható. Így például a rekombináza kifejeződését egy interferonnal indukálható promoterral szabályozva deletálható egy adott gén a májban, de nem – vagy csak igen kis mértékben – a többi szövetben [Kühn és munkatársai, *Science* 269, 1427 (1995)].

Mindeddig az invertáz/reszolváz család két tagját használták fel az eukarióta genomok módosítására. A *Mu* bakteriofág egy mutánsának Gin invertáza egy DNS-szakasz inverzióját katalizálja növényi protoplasztokban kofaktorok nélkül. Felfedezték azonban, hogy ez a mutáns hiperrekombinatív, azaz a természetes rekombinációs szekvenciáktól különböző helyeken is elvágja a DNS-szálat, ami nem kívánt, részlegesen letális rekombinációs eseményekhez vezet a növényi protoplaszt genomjában. A *Streptococcus pyogenes* β -rekombináza egérsejt-tenyészetekben kivágja a rekombi-



nációs szekvenciák közötti szakaszokat. A kivágással egyidőben azonban inverziót is megfigyeltek, ami alkalmatlanná teszi ezt a rendszert az eukarióta genomok szabályozott módosítására.

Az eukarióta genomok módosítása a Cre és Flp rekombinázzal számos hátránnyal jár. Deléció esetében, azaz amikor a rekombináció két tandem ismétlődő *loxP* vagy *FRT* rekombinációs szekvencia között történik egy genomban, elvesz az a DNS-szakasz, amely a két ismétlődés között volt. Ennek megfelelően az a gén, amely egy ilyen DNS-szakaszon helyezkedik el, maradandóan hiányozni fog a sejtéből vagy szervezetéből. Ez lehetetlenné teszi az eredeti állapot helyreállítását a gén funkciójának egy későbbi állapotban, például a szervezet egy későbbi fejlődési szakaszában végzendő vizsgálatához. A DNS-szakasz visszafordíthatatlan elvesztése megelőzhető a megfelelő szakasz invertálásával. Egy gén inverzióval inaktiválható anélkül, hogy elveszne, és újra bekapcsolható egy későbbi fejlődési állapotban vagy egy kifejezett állapotban vissza-rekombinálással, ami a rekombináz időben szabályozott expressziójával valósítható meg. Azonban akár a Cre, akár az Flp rekombinázt használjuk ebben a módosított eljárásban, az azzal a hátránnyal fog járni, hogy az inverzió nem szabályozható, mivel a rekombinációs szekvenciák nem változnak meg a rekombinációs esemény következtében. Emiatt a rekombinációs események ismétlődnek, és így a megfelelő gén inaktiválódása a megfelelő DNS-szakasz átfordulása következtében a célsejtek közül csak néhányban, a legjobb esetekben is csak 50 %-ában fordul elő. A probléma megoldására legalább részben történtek erőfeszítések mutáns *loxP* szekvenciák szerkesztésével, amelyek nem al-

kalmasak további reakciókra egy rekombináció után. Azonban a hátrányt itt a reakció egyedisége jelenti, azaz nincs lehetőség egy későbbi aktiválásra vagy vissza-rekombinálásra, ha a gént egyszer inverzióval inaktiválták.

Az Flp rekombináznak egy további hátránya a 37 °C-on gyenge hőstabilitása, ami jelentősen korlátozza a rekombinációs reakció eredményességét a magasabbrendű eukariótákban, például egerekben, amelyek testhőmérséklete körülbelül 39 °C. Emiatt a vad típusú rekombináznál jobb hőstabilitású Flp mutánsokat készítettek, de még ezek rekombinációs eredményessége is alacsonyabb, mint a Cre rekombinázé.

A szekvencia-specifikus rekombinázorok használata helyet talál az orvoslásban, azaz a génterápiában is, ahol a rekombinázorok fogják integrálni a kiválasztott DNS-szakaszokat a megfelelő humán célsejtek genomjába stabil és irányított módon. Mind a Cre, mind az Flp képes az intermolekuláris rekombináció katalizálására. Mindkét rekombinázor rekombinál egy plazmid-DNS-t – amely tartalmaz egy másolatot a megfelelő rekombinációs szekvenciából – egy megfelelő rekombinációs szekvenciával, amely előzőleg, homológ rekombinációval lett az eukarióta genomba inszertálva. Az a kíváncsi azonban, hogy ez a reakció az eukarióta genomban „természetesen” előforduló rekombinációs szekvenciákkal legyen megvalósítható. Mivel a *loxP* 34, az *FRT* 54 nukleotid hosszúságú, az ilyen rekombinációs szekvenciák előfordulása a genom részeként statisztikusan rendkívül valószínűtlen. Még ha rekombinációs szekvenciák jelen is vannak, a reakció megfordításával kapcsolatos, fent leírt hátrány továbbra is létezik, azaz a Cre és Flp



rekombinációk kivághatják az inszertált DNS-szakaszt az intramolekuláris rekombinációval létrejött, eredményes integrálódás után.

Így tehát találmányunk egyik feladata egy egyszerű és szabályozható rekombinációs rendszer és a működtetéséhez szükséges eszköz biztosítása. Találmányunk további feladata egy olyan rekombinációs rendszer és a szükséges eszköz biztosítása, amellyel megvalósítható egy kívánt DNS-szekvencia stabil és irányított integrálása.

Az említett feladatokat az igénypontokban jellemzett ismeretanyaggal oldottuk meg.

Találmányunkat az alábbiakban az ábrák segítségével magyarázzuk meg.

Az 1. ábrán a rekombinációs reakciók, nevezetesen az Int integráz által katalizált beépítés és kivágás folyamatábrája látható. Egy superhelikális plazmid-DNS (fent) egy másolatot tartalmaz az attP rekombinációs szekvenciából. Az attP öt úgynevezett kötőkart tartalmaz az Int számára (P1, P2, P1', P2', P3') és két kötőmagot (C és C', fekete nyilakkal jelölve), három kötőhelyet az IHF számára (H1, H2, H'), két kötőhelyet a Xis számára (X1, X2), valamint az úgynevezett átfedő területet (üres téglalap) ahol az aktuális DNS-szál cseréje megtörténik. Az attP partner-szekvenciája, az attB egy lineáris DNS-szakaszon látható; két kötőmagot (B és B', üres nyilakkal jelölve) tartalmaz az Int számára és egy átfedő területet. Az attP és attB közötti rekombinációhoz az Int és az IHF szükséges, és az eredmény a plazmid beépülése az attB-t hordozó DNS-szakaszba. Ezáltal abban két új, hibrid rekombinációs szekvencia, az attL és az attR je-

lenik meg, amelyek célszekvenciaként szolgálnak a kivágáshoz. Az utóbbi reakcióhoz az Int, az IHF és egy további kofaktor, a λ -fág által kódolt Xis szükséges.

A 2A. ábrán az integráz expressziós vektor sematikus felépítése, a 2B. ábrán egy Western-analízis eredménye látható. (A): a pKEXInt vektor tartalmazza a vad típusú integráz génjét, a pKEXInt-h a mutáns Int-h génjét, és a pKEXInt-h/218 vektor a mutáns Int-h/218 génjét. A pKEX kontroll vektorban nincs Int gén. A vad és a mutáns integráz-géneket szürke hasábok jelzik. A kódoló szakaszok után jelző szekvenciák következnek az RNS-feldolgozás számára, amelyek garantálják a megfelelő mRNS-ek (vonalkázott hasábok) fokozott intracelluláris stabilitását (ezek az SV-40, a t-Ag kivágás és poliA szignálok). Az integráz gének kifejeződését a humán citomegália-vírus (CMV) promotere szabályozza. (B): miután a megfelelő vektort bejuttattuk a B2 és B3 riporter sejtvonalakba, a sejteket lizáljuk és a fehérjét molekulatömegük szerint elválasztjuk egy SDS-lemezen. Az Int-h fehérje jelenlétét a vad típusú Int fehérjével szembeni poliklonális egér-antitesttel tesszük láthatóvá (2. és 4. sáv). Az Int helyét a gélen egy nyíl jelzi.

A 3. ábrán a szubsztrát-vektorok szerkezetének vázlata látható. (A): pGFBattB/attP. A vektor az ApaLI restrikciós nukleázal van linearizálva. A nagy fekete nyilak mutatják az attB és attP rekombinációs szekvenciák helyét és irányát. A rekombinációs szekvenciák a GFP (zöld fluoreszkáló fehérje) génjével szomszédosak, amely fordított irányultságú a CMV promoterhez képest. A pA a poliA szignált jelenti. A neo rezisztenciagén – amit az

SV-40 promoter fejez ki és lehetővé teszi a stabil riporter-sejtvonalak szelekcióját – szintén a vektoron helyezkedik el. Feltüntettük az NcoI restrikciós enzim felismerő helyeit is. Az attB és attP között végrehajtott egyesítő rekombináció a GFP gén inverzióját és ezáltal expresszióját eredményezi. A kis, üres és telt nyilak az egyes PCR-primerek (p1 – p7) helyzetét és irányultságát jelzik. (B): pGFPattL/attR. A vektor szerkezete azonos az előbbiével, csak a rekombinációs szekvenciák különböznek. A GFP génje 3' – 5' irányultságú a CMV promoterhez képest. A vonalkázott téglalap a Southern-analízishez használt szondát (próba) jelenti.

A 4A – D. ábrákon a riporter-sejtvonalakban lezajlott egyesítő rekombináció kimutatásának elve látható. A DNS-molekulákat 1,2 %-os agarózon elválasztjuk (etídium-bromiddal festjük), majd PCR-val sokszorozzuk. (A): Reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR). A pKEX és pKEXInt-h (2A. ábra) vektorokat egymástól függetlenül juttattuk be a megfelelő, B1 – B3 riporter sejtvonalakba elektroporációval. Az izolált poliA mRNS-t feldolgozva a RT-PCR analízis kimutatja, hogy a várt – a p3/p4 primer párral képezett (3. ábra) – termék csak akkor jelenik meg, ha a sejteket a pKEXInt-h vektorral transzformáltuk (1., 3. és 5. sávok). Az ugyanazon RNS-kivonatban található β -aktin-gént az RNS-tartalom kontrolljaként sokszorozzuk. M sáv: DNS-„létra” (molekulatömegkalibrációs keverék); O sáv: RNS-templát nélküli RT-PCR kontroll. (B, C): a genom PCR-analízise. A megfelelő sejtvonalakból izoláljuk a genom DNS-t 72 órával az elektroporáció után, majd sokszorozzuk a p3/p4 (3. ábra) és a p1/p2 (3. ábra) primer pá-



rokkal. A sávok számozása és elnevezése megegyezik a 4A. ábráéval. (D): kivágásos kísérlet. Az izolált genom DNS-t a p5/p6 (3. ábra) primer párral sokszorozzuk. A kivágás termékének (420 bp) helyzetét nyíllal jelöljük. A sávok számozása és elnevezése megegyezik a 4A. ábráéval.

Az 5. ábrán a riporter-sejtvonalakban lezajlott inverzió ki-mutatásának sémája látható PCR-val és Southern-hibridizációval a DNS-molekulák 1,2 %-os agarózgélen való elválasztása után. (A): PCR-analízis. A pKEX és pKEXInt-h vektorokkal kezelt B1, B2, B3 és BL60 sejtvonalakból izolált genom-DNS egy frakcióját sokszorozzuk a p3/p4 és p5/p7 (3. ábra) primer párokkal. A GFP gén integráz-katalizálta inverziójára visszavezethető PCR-termékek az 1., 3. és 5. sávban láthatók. M sáv: DNS-létra; O sáv: genom-DNS nélküli PCR-kontroll. (B): Southern-analízis: az 5A. ábrán analizált DNS-frakció maradékát a NcoI restrikciós enzimmel inkubáljuk, utána agarózgél elektroforézissel elválasztjuk molekulatömeg szerint, és átvisszük egy nitrocellulóz membránra. A GFP-t hordozó DNS-fragmentumok egy radioaktivitással jelölt szonda segítségével láthatóvá tehetők (3B. ábra) és jelzik a rekombinációt. 9. sáv: nem rekombinálódott pGFPattB/attP; 10 sáv: rekombinálódott pGFPattB/attP.

A 6A. ábrán mutatjuk be az attB és attH rekombinációs szekvenciákat tartalmazó nukleinsav-szekvenciákat. A 6B. ábrán az attP és attP* parciális szekvenciák láthatók. (A): az attB és attH szekvenciák összehasonlítása. Az attB-ben az Int B és B' kötőmagjait a vonal jelzi a szekvencia fölött. Az attH-ban az Int H és H' kötőmagjait a szaggatott vonal jelzi. Az átfedő

szekvenciákat a téglalapok foglalják magukban. A szekvenciák közötti különbségeket a függőleges kettős vonalak jelzik. A nukleotidok számozása a magokban és az átfedő területen az átfedő terület „O”-val jelölt közepéhez képest történik Landy és Ross szerint [*Science*, 197, 1147 (1977)]. A -9-től +11-ig terjedő szekvenciák az attB, illetve attH helyek. (B): az attP és attP* parciális szekvenciák összehasonlítása az előbbiek szerint; a jelölések megegyeznek a 6A. ábrán alkalmazottakkal.

A 7. ábrán az attH és attP* közötti rekombináció sémája látható a pACH vektoron, *E. coli*-ban, agarózgél elektroforézissel történt elválasztás után. A pACH szubsztrát-vektor a megfelelő prokarióta expressziós vektorral együtt volt bejuttatva a megfelelő *E. coli* törzsekbe (Int-h a CSH26-ba és Int-h/218 a CSH26- δ -IHF-ba). A plazmid-DNS-t a szelekció után 36 órával izoláltuk, a HindIII és AvaI rekombinációs enzimekkel inkubáltuk, elválasztottuk és az agarózgélben láthatóvá tettük. Az inverzióval keletkezett rekombinációs fragmentumokat jelöltük az „inverz” szóval. A nem rekombinálódott DNS helyzetét jelzi a „pACH” jelölés. 1. és 12. sáv: DNS-létra; 2. és 3. sáv: a nem rekombinálódott pACH expressziós vektor és a DNS-e; 4-7. sávok: a CSH26-ból izolált DNS; 8-11. sávok: a CSH- δ -IHF-ből izolált DNS.

A 8. ábrán sematikusan látható a pEL13 vektor integrálásának stratégiája az attH genomiális lókuszába, valamint a kimutatás módjának elve. A pEL13 integrációs vektor hordozza a rezisztenciagént (a „hygr” jelzésű nyíl) az Int-h génjét (az „Int-h” jelzésű nyíl) a CMW promotor kontrollja alatt, és az attP* másolatát (üres négyszög „attP*/P*OP*” felirattal). Az Int-h kifeje-

zódik a vektornak a BL60 sejtekbe juttatása után (2B. ábra). Ezt követően a rekombinááz katalizálja az intermolekuláris rekombinációt az *attP** és a kromoszomális *attH* (vonalkázott téglalap „*attH/HOH'*” felirattal) között, aminek eredményeként a pEL13 vektor beépül a BL60 sejtek genomjába. Azok a sejtek, amelyekben a vektor stabilan integrálódott, kiválaszthatók és azonosíthatók egy PCR-val, amelyet az *attX1/B2* primer párral végzünk (az „*attX1*” és „*B2*” jelzésű nyilak). Az *EcoRV* és *SphI* feliratok a megfelelő rekombinációs enzimek felismerési helyeit jelzik.

A 9. ábrán látható az *attP** (pEL13) és az *attH* közötti intermolekuláris rekombináció kimutatásának sémája a BL60 sejtekből. A genom DNS-t 31 különböző sejtpopulációból izoláltuk és az *attX1/B2* primer párral (8. ábra) sokszoroztuk. Az izolálás a pEL13 elektroporációját követő több héten át folytatott szelekciós után történt. A PCR termékeit agarózgél-elektroforézissel elválasztottuk és láthatóvá tettük. A várt termék (295 bp) helyzetét a gélen egy nyíllal jelöltük meg. Ezt követően a terméket a DNS szekvenciájának analízisével vizsgáltuk tovább. A jobb szélen egy DNS-létra helyezkedik el.

A „transzformáció” vagy „transzformálni” szavak szóhasználatunkban egy nukleinsav-szekvencia bármilyen módon való bejuttatását jelenti egy sejtbe. A bejuttatás lehet például egy transzfekeció vagy lipofekció, vagy kivitelezhető a kalciumos módszer, az elektrosokk módszer vagy egy oocita-injekció segítségével. A fenti szavak jelentik továbbá egy virális nukleinsav-szekvencia – amely például rekombinációs szekvenciákat és egy terápiás gént vagy génfragmentumot tartalmaz – bejuttatását is az adott vírus

számára természetes módon. A virális nukleinsav-szekvenciának nem szükséges meztelen nukleinsavként jelen lennie, hanem be lehet burkolva a vírusfehérje-köpenybe. Így tehát a „transzformáció” és „transzformálni” szavak nem csak azt az eljárást jelentik, amelyeket rendszerint értünk alattuk.

A „származék” szó találmányunkban azon *attB*, *attP*, *attL* és *attR* szekvenciákat jelenti, amelyekben egy vagy több, legfeljebb hat, előnyösen kettő, három, négy vagy öt módosulás (szubsztitúció) van a természetben előforduló rekombinációs szekvenciákhoz képest.

A „homológ” vagy „hasonló” szavak a rekombinációs szekvenciákkal kapcsolatban használva olyan nukleinsav-szekvenciákat jelentenek, amelyek körülbelül 70 %-ban, előnyösen körülbelül 80 %-ban, előnyösebben körülbelül 85 %-ban, még előnyösebben körülbelül 90 %-ban, ennél is előnyösebben körülbelül 95 %-ban, és legelőnyösebben körülbelül 99 %-ban megegyeznek a természetben előforduló rekombinációs szekvenciákkal.

A „vektor” szó egy, a természetben előforduló vagy szintetikus úton összeállított szerkezetet jelent, amelynek szerepe nukleinsavak felvétele, szaporítása, expressziója vagy átvitele. Vektorok például a plazmidok, fágmidok, kozmidok, mesterséges kromoszómák, bakteriofágok, vírusok vagy a retrovírusok.

A λ -bakteriofág integráza (szokásos jelzése: „Int”) a Cre és az Flp enzimekhez hasonlóan a szekvencia-specifikus, konzervatív DNS-rekombinázok családjába tartozik. Az Int két különböző – nevezetesen az *attB* és az *attP* – rekombinációs szekvencia közötti egyesítő rekombinációt katalizálja. Az *attB* 21 nukleotidot tar-



talmaz és eredetileg az *E. coli* genomjából izolálták [Mizuuchi és Mizuuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3220 (1980)]. Az *attP* viszont sokkal hosszabb: 243 nukleotidból áll és a λ -bakteriofág genomjában található [Landy és Ross, *Science* 197, 1147 (1977)]. Az *Int* rekombináz két kötőhelyet tartalmaz az *attP* és kettőt az *attB* számára. Az *Int* biológiai funkciója a körkörös fág-genom szekvencia-specifikus beépítése az *attB* lókusznál az *E. coli* kromoszomájába. Az *Int*-nek szüksége van egy kofaktor fehérjére, az úgynevezett integrációs gazda-faktorra (szokásos jelzése: „IHF”) az egyesítő rekombinációhoz [Kikuchi és Nash, *J. Biol. Chem.* 253, 7149 (1978)]. Az IHF-re az *attP*-vel képzett funkcionális rekombinációs komplex felépüléséhez van szükség. Az egyesítő reakció másik kofaktora az *attP* DNS-negatív szuperhelikális állapota. Végül az *attB* és *attP* közötti rekombináció két új rekombinációs szekvencia, nevezetesen az *attL* és az *attR* kialakulásához vezet, amelyek szubsztrátként és felismerési szekvenciákként szolgálnak egy további rekombinációs reakcióhoz, a kivágáshoz. A λ -bakteriofág beépülésének részletes leírása Landy összefoglalójában olvasható el [*Annu. Rev. Biochem.* 58, 913 (1989)] .

A fág-genom kivágását a baktérium genomjából szintén az *Int* rekombináz katalizálja. Ehhez az *Int* és az IHF mellett egy további kofaktorra is szükség van, amit ugyancsak a λ -bakteriofág kódol. Ez az excizionáz (szokásos jelzése: „XIS”), aminek két kötőhelye van az *attR*-n (Gottesman és Weisberg: „*The Bacteriophage Lambda*”, pp. 113.; Cold Spring Harbor Laboratory, 1971). Az egyesítő rekombinációval szemben a kivágáshoz nincs szükség a rekombinációs szekvenciák DNS-negatív szuperhelikális állapotá-

ra, fennállása azonban megnöveli a rekombinációs reakció haté-
 sosságát. A kivágási reakció hatékonyságát tovább javítja egy
 második kofaktor, a „FIS” (inverziót serkentő faktor) jelenléte,
 amely az excizionázzal kapcsolódva fejti ki hatását (Landy, *id.*
közl.). A kivágás genetikai szempontból pontosan az egyesítési
 reakció megfordítása, azaz újra keletkeznek az *attB* és *attP* re-
 kombinációs szekvenciák. A λ -bakteriofág kivágásáról ugyancsak
 Landy-tól tudhatunk meg részleteket.

Találmányunk egyik tárgya egy eljárás DNS szekvencia-speci-
 fikus rekombinálására eukarióta sejtekben, amely eljárás a kö-
 vetkezőket foglalja magában: a) egy első DNS-szekvencia bejutta-
 tása egy sejtbe; b) egy második DNS-szekvencia bejuttatása egy
 sejtbe; és c) a szekvencia-specifikus rekombináció végrehajtása
 a λ -bakteriofág *Int* integrázával. Előnyös egy olyan eljárás, ahol
 az első DNS-szekvencia az 1. számú szekvenciavázlat szerinti
attB szekvenciát vagy annak egy származékát tartalmazza, és a
 második DNS-szekvencia a 2. számú szekvenciavázlat szerinti *attP*
 szekvenciát vagy annak egy származékát tartalmazza. Előnyös to-
 vábbá egy olyan eljárás, ahol az első DNS-szekvencia a 3. számú
 szekvenciavázlat szerinti *attL* szekvenciát vagy annak egy száрма-
 zékát tartalmazza, és a második DNS-szekvencia a 4. számú szek-
 venciavázlat szerinti *attR* szekvenciát vagy annak egy származé-
 kát tartalmazza, valamint a c) lépésben a szekvencia-specifikus
 rekombináció egy *Int* és egy *Xis* faktor részvételével megy végbe.

A találmány szerinti eljárás nem csak a természetes *attB*
 és/vagy *attP* szekvenciákkal vagy *attL* és/vagy *attR* szekvenciák-
 kal hajtható végre, de módosított, azaz szubsztituált *attB* és/

vagy attP szekvenciákkal vagy attL és/vagy attR szekvenciákkal is. Így például egyesítő rekombinációt figyeltek meg a λ -bakteriofág és az *E. coli* attP és attB homológ szekvenciái (a vad típusú szekvenciák mutánsai) között, amelyekben egy szubsztitúció van vagy egy kombináció fordul elő a következő szubsztitúciókból a következő pozíciókban az attB szekvenciában: G, T (a -9 pozícióban); A,C,G (-8); C,A,T (-7); T,G,A (-6); C,A (-5); A (-4); G,A (-3); A,C,G (-2); A,C,G (-1); A,C,G (0); T,C,G (+1); A,C,G (+2); T,G,C (+3); A,G,T (+4); A,C,G (+5); G,T (+6); G,T (+7) G,T,A (+8); C,G,A (+9); C,G,A (+10); T,A,C (+11) [Nash, *Annu. Rev. Genet.* 15, 143 (1981); Nussinov és Weisberger, *J. Biol. Struct. Dynamics* 3, 1134 (1986)] és/vagy az attP szekvenciában: T (+1); C (+2) és A (+4) (Nash, *id. közl.*).

Így tehát találmányunk tárgya egy eljárás, ahol az alkalmazott attB és attP szekvenciákban egy vagy több szubsztitúció van a természetes attB (1. számú szekvenciavázlat) és a természetes attP (2. számú szekvenciavázlat) szekvenciákhoz képest. Találmányunk tárgya továbbá egy olyan eljárás, ahol az alkalmazott attL és attR szekvenciákban egy vagy több szubsztitúció van a természetes attL (3. számú szekvenciavázlat) és a természetes attR (4. számú szekvenciavázlat) szekvenciákhoz képest. Előnyös egy olyan eljárás, ahol a rekombinációs szekvenciákban egy, kettő, három, négy vagy öt szubsztitúció van. A szubsztitúciók akár az átfedő területen (6A. ábra, üres téglalap), akár a magterületen (6A. ábra, vonalak) előfordulhatnak. A teljes átfedő terület – amely 7 nukleotidot tartalmaz – is helyettesítve lehet. Előnyösebb egy olyan eljárás, ahol az attB és attP szekvenciák szubsz-

titúciói mind a magterületen, mind az átfedő területen előfordulnak. Előnyös egy helyettesítést bevezetni az átfedő területen és egy vagy két helyettesítést a magterületen.

A találmány szerinti eljárás szempontjából nincs szükség egy megfelelő szubsztitúció bevezetésére az attP szekvenciában, ha az attB-ben elvégezzük azt; ugyanígy nincs szükség az attR szubsztituálására, ha az attL szekvenciát szubsztituáljuk; és ez megfordítva is igaz. A rekombinációs szekvenciák helyettesítés formájában végrehajtott módosítását úgy kell megválasztani, hogy a rekombináció a módosítás(ok) dacára is megtörténhessen. Az ilyen szubsztitúciók felsorolását például Nash (*id. közl.*) és Nussinov és Weisberg (*id. közl.*) munkáiban találhatjuk meg, de nem tekintjük korlátozónak azokat. Másféle módosítások könnyen vezethetők be például mutagenezissel és hatásuk rekombinációs vizsgálatokkal ellenőrizhető.

Ennek megfelelően találmányunk tárgyát képezi egy olyan eljárás, ahol akár az alkalmazott attB szekvencia egy vagy több szubsztitúciót tartalmaz a természetes – az 1. számú szekvenciavázlatban megadott – attB szekvenciához képest, vagy az alkalmazott attP szekvencia egy vagy több szubsztitúciót tartalmaz a természetes – a 2. számú szekvenciavázlatban megadott – attP szekvenciához képest; vagy akár az alkalmazott attL szekvencia egy vagy több szubsztitúciót tartalmaz a természetes – a 3. számú szekvenciavázlatban megadott – attL szekvenciához képest, vagy az alkalmazott attR szekvencia egy vagy több szubsztitúciót tartalmaz a természetes – a 4. számú szekvenciavázlatban megadott – attR szekvenciához képest. Így tehát egy vagy több

szubsztitúció a rekombinációs szekvenciák egyikében nem szükségszerűen vonja maga után a megfelelő szubsztitúciót a másik rekombinációs szekvenciában.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös megvalósításában az *attB* szekvencia 21 nukleotidot tartalmaz és megfelel az *E. coli* genomjából eredetileg izolált szekvenciának (Mizuuchi és Mizuuchi, *id. közl.*), és az *attP* szekvencia 243 nukleotidot tartalmaz, és megfelel a λ -bakteriofág genomjából eredetileg izolált szekvenciának (Landy és Ros, *id. közl.*).

A találmány szerinti eljárás egy további megvalósításában az *attL* szekvencia 102 nukleotidot, az *attR* szekvencia 162 nukleotidot tartalmaz, és mindkét szekvencia megfelel az *E. coli* genomjából eredetileg izolált szekvenciáknak (Landy, *id. közl.*).

A találmány szerinti eljárás megvalósítása érdekében az első DNS-szekvencia a rekombinációs szekvencia mellett további DNS-szekvenciákat is tartalmazhat, amelyek lehetővé teszik a beépülést az eukarióta sejt genomjának kívánt lókuszába. Az ilyen rekombináció a homológ rekombináció útján valósul meg a sejt belső rekombinációs mechanizmusain keresztül. Az említett rekombinációhoz a további DNS-szekvenciáknak homológoknak kell lenniük a megcélzott lókuszs DNS-ével, valamint az *attB* szekvencia 3'-végén és az *attL* szekvencia 5'-végén kell elhelyezkedniük. A szakemberek tudják, hogy milyen fokú homológiára van szükség, illetve milyen hosszúaknak kell lenniük a 3' - és 5' -szekvenciáknak ahhoz, hogy egy homológ rekombináció a kellő valószínűséggel bekövetkezhesen [Capecchi, *Science* 244, 1288 (1989)].

Az *attP* és *attR* rekombinációs szekvenciákat hordozó második



DNS-szekvencia ugyancsak tartalmazhat olyan DNS-szekvenciákat, amelyek a homológ rekombinációval történő integrálódáshoz szükségesek. A találmány szerinti eljáráshoz mind az első, mind a második DNS-szekvencia tartalmazhat további DNS-szekvenciákat. Előnyös egy olyan eljárás, ahol mindkét DNS-szekvencia tartalmaz további DNS-szekvenciákat.

Az első és második DNS-szekvenciák bejuttatása – a további DNS-szekvenciákkal vagy azok nélkül – akár egymás után, akár ko-transzformációval valósítható meg, ha a DNS-szekvenciák két különböző DNS-molekulán helyezkednek el. Előnyös egy olyan eljárás, ahol az első és második DNS-szekvenciák – a további DNS-szekvenciákkal vagy azok nélkül – egyetlen DNS-molekulán helyezkednek el és azon jutnak be az eukarióta sejtekbe. Továbbá az első DNS-szekvencia bejuttatható egy sejtbe, a második DNS-szekvencia is bejuttatható egy másik sejtbe, majd ezt követően a sejteket fuzionáltatjuk. A „fúzió” szót itt a szervezetek keresztezésétől a sejtfúzióig terjedő legszélesebb értelemben használjuk.

A találmány szerinti eljárás például egy, a fordított irányultságú rekombinációs szekvenciák között elhelyezkedő DNS-szakasz invertálására alkalmazható egy intramolekuláris rekombinációban. Továbbá a találmány szerinti eljárás egy, az azonos irányultságú rekombinációs szekvenciák között elhelyezkedő DNS-szakasz kivágására alkalmazható egy intramolekuláris rekombinációban. Ha mindkét rekombinációs szekvencia 5' – 3' vagy 3' – 5' irányultságú, akkor azonos irányultságúak. Fordított irányultságúak a rekombinációs szekvenciák, ha például az attB szekvencia 5' –



3', de az *attP* szekvencia 3' - 5' irányultságú. Ha mindkét rekombinációs szekvencia egy homológ rekombináció útján beépül egy exon 5' - és 3' - intron szekvenciáiba, és a rekombinációt egy integrázzal hajtjuk végre, akkor fordított irányultságú rekombinációs szekvenciák esetén az exon átfordul (invertálódik), míg azonos irányultságú rekombinációs szekvenciák esetében kivágódik (deletálódik). Ezzel az eljárással az adott gén által kódolt polipeptid elveszítheti az aktivitását, mert a gén transzkripcióját az inverzió vagy a deléció leállíthatja úgy, hogy nem keletkezik (teljes értékű) transzkriptum. Ezen az úton vizsgálható például a kódolt polipeptid biológiai szerepe.

Az első és/vagy második DNS-szekvenciák azonban további nukleinsav-szekvenciákat is tartalmazhatnak, amelyek egy vagy több, érdeklődésre számot tartó polipeptidet is kódolnak. Így például egy struktúrfehérje, egy enzim vagy egy szabályozó fehérje vihető be a rekombinációs szekvenciákkal a genomba, ahol az intramolekuláris rekombináció után átmenetileg kifejeződik. A bevitt polipeptid lehet endogén vagy exogén. Bevihető továbbá egy jelző fehérje is. A szakemberek tudják, hogy a találmány szerinti eljárás alkalmazásainak fenti felsorolása csak példákat szolgáltat és nem korlátozó jellegű. A találmány szerinti alkalmazásokat ezidáig csak a Cre és FLP rekombinázzokkal valósították meg, amint az Kilby és munkatársai összefoglalójában olvasható [*Trends Genet.* 9, 413 (1993)].

Továbbá, a találmány szerinti eljárás DNS-szegmentumok kivágására vagy invertálására alkalmazható egy vektorban, intramolekuláris rekombináció útján, episzomális szubsztrátokon. Egy ki-

vágásos reakcióval eltávolíthatók például a burkoló szekvenciák az úgynevezett helper-vírusokból. Ennek az eljárásnak tág alkalmazási lehetőségei vannak a génterápiás alkalmazásokra szolgáló vektor vírusok ipari előállításában [Hardy és munkatársai, *J. Virol.* 71, 1842 (1997)].

Az intermolekuláris rekombináció két DNS-molekula egyesüléséhez vezet, amelyek mindegyikén van egy másolat az *attB* és *attP* vagy az *attL* és *attR* szekvenciákból. Így például elsőként az *attB* vihető be homológ rekombinációval egy sejt genomjának egy ismert, jól jellemzett lókuszába. Ezt követően egy, az *attP* szekvenciát hordozó vektor integrálható intermolekuláris rekombinációval az említett genomiális *attB* szekvenciába. Előnyös, ha ebben az eljárásban az Int-h/218 mutáns integrázt fejeztetjük ki, amelynek génjét egy második DNS-vektoron kotranszfektáltuk. További szekvenciák helyezkedhetnek el az *attP*-t hordozó vektoron, mint amilyen egy adott jelző fehérje génje a *loxP/FRT* szekvenciákhoz csatolva. Ezzel az elrendezéssel elérhető például, hogy ha különböző gének expressziójának összehasonlító vizsgálatát végezzük egy sejttípusban, akkor az említett génekre nem gyakorol pozitív vagy negatív hatást a megfelelő, genomiális integrációs lókuszt.

A találmány szerinti eljárás kivitelezésekor egy integráznak kell hatnia a rekombinációs szekvenciákra. Az integráz vagy annak génje és/vagy a Xis faktor vagy annak génje már jelen lehet az eukarióta sejtben, mielőtt bejuttatjuk az első és második DNS-szekvenciákat. Az előbbiek bejuttathatók az első és a második DNS-szekvencia bejuttatása között vagy mindkét DNS-szekven-

cia bejuttatása után is. A szekvencia-specifikus rekombinációhoz használt integráz előnyösen abban a sejtben fejeződik ki, amelyben a reakciót végrehajtjuk. E célból egy harmadik, egy integráz-gént hordozó DNS-szekvenciát juttatunk a sejtekbe. Ha a szekvencia-specifikus rekombinációt az attL/attR rekombinációs szekvenciákkal végezzük, akkor egy Xis faktor gént (negyedik DNS-szekvencia) is bejuttathatunk a sejtekbe. Legelőnyösebb egy olyan eljárás, amikor a harmadik és/vagy a negyedik DNS-szekvenciát homológ rekombinációval vagy véletlenszerűen integráljuk az eukarióta sejt genomjába. Előnyös továbbá egy olyan módszer, ahol a harmadik és/vagy a negyedik DNS-szekvencia regulációs szekvenciákat is tartalmaz, amelyek térben és/vagy időben szabályozzák az integráz és/vagy a Xis faktor génjének expresszióját.

A „térbeli expresszió” kifejezés ez esetben azt jelenti, hogy a rekombináz és a Xis faktor csak egy adott sejttípusban fejeződik ki egy sejtspecifikus promoter alkalmazása következtében, és csak azokban a sejtekben katalizálja a rekombinációt (például máj-, vese- vagy idegsejtek, vagy az immunrendszer sejtjei). Az integráz és/vagy a Xis faktor expressziójának szabályozása viszont olyan promoterekkel oldható meg, amelyek egy adott fejlődési szakasztól vagy szakaszban, illetve egy kifejelett szervezetben egy adott időpontban válnak aktívvá. Az adott időben bekövetkező expresszió elérhető indukálható promoterek alkalmazásával is, mint amilyenek az interferon- vagy tetraciklin-függő promoterek [Müller, *Mech. Develop.* 82, 3 (1999)].

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott integráz a λ -bakteriofág vad típusú vagy módosított integráza lehet. Mivel a

vad típusú integráz csak egy kofaktoral, nevezetesen az IHF-el képes végrehajtani a rekombinációs reakciót, a találmány szerinti eljárásban előnyös egy módosított integrázt használni. Ha vad típusú integrázt alkalmazunk, úgy amellet szükség van az IHF kofaktorra is. A módosított integráz úgy van módosítva, hogy az említett integráz az IHF nélkül is képes a rekombinációs reakció végrehajtására. A módosított polipeptidek létrehozása és szűrővizsgálatuk a kívánt aktivitásra a szakterület jelenlegi állása mellett egyszerű feladat (Erlich: „PCR Technology”; Stockton Press, 1989). A λ -bakteriofág integrázának két Int mutánsa előnyös: az Int-h és az Int-h/218 [Müller és munkatársai, *Cell* 20, 721 (1980); Christ és Dröge, *J. Mol. Biol.* 288, 825 (1999)]. Az Int-h egy lizint tartalmaz a 174. helyzetben a vad típusú enzim glutaminsava helyett. Az Int-h/218-ban egy további lizin van a 218. helyzetű glutaminsav helyett is, és PCR-mutagenézissel állították elő az Int-h génjéből. Az említett mutánsok képesek az attB és attP közötti, valamint az attL és attR közötti rekombináció katalizálására az IHF és Xis kofaktorok, illetve a negatív szuperhelikális állapot nélkül is az *E. coli*-ban és *in vitro*, például tisztított szubsztráton egy kémcsőben. Az eukarióta sejtekben a mutánsok csak a Xis kofaktort igénylik az attL/attR közötti rekombinációhoz. Egy további kofaktor, például a FIS használatával újabb javulás érhető el az attL/attR rekombináció eredményességében. Előnyös az Int-h/218 mutáns használata, mivel ez a mutáns fokozott hatékonysággal katalizálja a kofaktor-független beépülési reakciót (Christ és Dröge, *id. közl.*).

A találmány szerinti eljárás minden eukarióta sejtben kivi-

telezhető. Ide értjük az összes típusú állati és növényi sejtet, amelyek sejttenyészetben is lehetnek. A sejtek lehetnek például oociták, embrionális őssejtek, a vérképzés őssejtjei, vagy bármilyen típusú, már differenciálódott sejtek. Előnyös egy olyan eljárás, ahol az eukarióta sejt egy emlős sejt. Előnyösebb egy olyan eljárás, ahol az emlős sejt egy ember, majom, egér, patkány, nyúl, hörcsög, kecske, szarvasmarha, juh vagy sertés sejtje.

Találmányunk egyik előnyös megvalósítása továbbá egy olyan eljárás, ahol adott esetben egy második szekvencia-specifikus rekombinációt is végrehajtunk a DNS-en a λ -bakteriofág integráza és egy Xis kofaktor segítségével. A második rekombinációhoz az attL és attR szekvenciákra van szükség, amelyek az attB és attP rekombinációs szekvenciák vagy származékaik közötti első rekombináció során keletkeztek. Így tehát a második szekvencia-specifikus rekombináció csak egy olyan eljárásra korlátozódik, amelyben megtörténik az attB és az attP rekombinációs szekvenciák vagy származékaik között az első szekvencia-specifikus rekombináció. Mind a vad típusú enzim, mind az Int mutánsok csak az úgynevezett egyesítő rekombinációt képesek katalizálni a további faktorok jelenléte nélkül, azaz rekombinálják az attB-t az attP-vel, de nem az attL-t az attR-el, ha stabilan integrálódtak a sejt genomjába. A vad típusú integráznak szüksége van az úgynevezett kivágó rekombinációhoz az IHF- és a Xis faktorra, valamint a negatív szuperhelikális állapotra. Az Int-h és Int-h/218 mutánsok csak a Xis faktort igénylik a kivágó rekombinációhoz. Így tehát lehetséges két rekombinációs reakciót lefuttatni egymás után, ellenőrzött módon, ha a második rekombinációs reakció-

hoz – a kivágáshoz – szükséges további faktorok is jelen vannak a sejtben. Ezzel a már használt rekombinációs rendszerek mellett új stratégiák építhetők fel a magasabbrendű eukarióta genomok módosítására. Ez azért lehetséges, mert a különböző rekombinációs rendszerek csak a saját rekombinációs szekvenciáikat tudják használni.

Így például az Int rendszer használható arra, hogy a *loxP* és/vagy az *FRT* szekvenciákat irányítottan építsük be egy eukarióta sejt genomjának egy adott lókuszába, és ott aktiváljunk egy gént a Cre és/vagy az Flp ellenőrzött expresszióján keresztül. Az Int rendszer használható arra is, hogy a használat, azaz a megfelelő rekombinázzal való rekombináció után eltávolítsuk a *loxP/FRT* szekvenciákat a genomból.

Előnyös továbbá egy olyan eljárás is, ahol egy további, a Xis faktor génjét hordozó DNS-szekvenciát juttatunk a sejtekbe. Legelőnyösebb egy olyan eljárás, ahol a további DNS-szekvencia egy regulátor-szekvenciát is tartalmaz, amely lehetőséget ad a Xis faktor gén kifejeződésének térbeli és/vagy időbeni szabályozására.

Így például az Int segítségével végzett, eredményes integráló intramolekuláris rekombináció (inverzió) után – ami egy génnek egy adott sejttypusban való aktiválódásához vagy inaktiválódásához vezetett – az említett gén egy későbbi időpontban újra aktiválható vagy inaktiválható a Xis expressziójának térben vagy időben szabályozott indukálásával, az Int egyidejű kifejeződése mellett.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy, az 1. számú szekven-

ciavázlatban megadott *attB* szekvencia vagy egy származéka és egy, a 2. számú szekvenciavázlatban megadott *attP* szekvencia vagy egy származéka alkalmazása, vagy egy, a 3. számú szekvenciavázlatban megadott *attL* szekvencia vagy egy származéka és egy, a 4. számú szekvenciavázlatban megadott *attR* szekvencia vagy egy származéka alkalmazása DNS szekvencia-specifikus rekombinációjára eukarióta sejtekben. Az eukarióta sejtek egy olyan szervezet, például egy emlős egy sejthalmazában lehetnek jelen, amelynek sejtjeiben nincsen integráz vagy Xis faktor. Az említett szervezet felhasználható más szervezetek létrehozására, amelyek sejtjeiben már van integráz vagy Xis faktor, tehát olyan utódok jönnek létre, amelyek sejtjeiben megvalósulhat a szekvencia-specifikus rekombináció. Így tehát találmányunk tárgyához tartozik egy integráz vagy integráz-gén, és Xis faktor vagy Xis-gén alkalmazása szekvencia-specifikus rekombináció megvalósítására eukarióta sejtekben.

Találmányunkhoz vezető munkánk során azonosítottunk egy szekvenciát – amit itt *attH*-nak jelölünk – a humán genomban, amely körülbelül 85 %-ban homológ az *attB* szekvenciával. Az *attH* rekombinációs szekvenciaként használható idegen DNS beépítéséhez az ember genomjába. Így tehát az *attP* második rekombinációs szekvencia úgy módosítható, hogy az integráz nagy eredményességgel hajthassa végre a rekombinációs reakciót. Feltalálók kimutatták, hogy az *attH* képes rekombinálódni az *attP* általuk módosított változatával – amit *attP**-nek neveznek és az 5. számú szekvenciavázlatban mutatnak be – az *E. coli* Int-h integráza közreműködésével. A humán sejtekkel végzett kísérletek kimutat-

ták, hogy az *attH* rekombinálódik az *attP**-vel, mint a humán genom részével is, ha az említett sejtek átmenetileg szintetizálják az *Int-h* enzimet.

Ebből következik az a lehetőség, hogy egy idegen, cirkuláris DNS-t – amelyben van egy *attP* rekombinációs szekvencia – stabilan integráljunk a humán genom természetes *attH* lókuszába. Az *attH* csak egy a humán genomban természetesen előforduló rekombinációs szekvenciák közül. A „*Human Genom Project*” keretében további, az *attB*-vel homológ szekvenciák azonosíthatók, amelyek szintén felhasználhatók egy idegen DNS beépítésére a humán genomba. Az említett, a humán genomban található és az *attB*-vel homológ szekvenciától függően választjuk meg a megfelelő *attP* rekombinációs szekvenciát az idegen, cirkuláris DNS számára. Előnyös egy olyan idegen, cirkuláris DNS, amely a természetes *attP* nukleotid-szekvenciáját tartalmazza. Előnyösebb a természetes *attP* szekvencia egy olyan származéka, amely legfeljebb 6, előnyösen 1 - 5, különösen 3 szubsztitúciót tartalmaz. Legelőnyösebb egy olyan idegen, cirkuláris DNS, amely az 5. számú szekvenciavázlatban bemutatott *attP** nukleinsav-szekvenciát tartalmazza, ami körülbelül 95 %-ban homológ az *attP* szekvenciával.

Az integráz akár egy polipeptidként, akár egy expressziós vektorral juttatható a sejtekbe. Továbbá, az integráz génje jelen lehet egy kifejezhető nukleinsav-szekvencia alakjában azon a DNS-molekulán, amely a természetes vagy módosított *attP* szekvenciát, vagy az *attP** szekvenciát is hordozza.

Az idegen, cirkuláris DNS – amelyen a természetes *attP* szekvencia, illetve annak egy származéka vagy homológja, vagy külö-

nösen az 5. számú szekvenciavázlat szerinti attP* szekvencia van – hordozza azt a terápiás gént vagy génfragmentumot is, amit be kívánunk juttatni a genomba. Terápiás gén lehet például a CFTR-gén, az ADA-gén, az LDL-receptor génje, a β -globin génje, a VIII. vagy IX. faktor génje, az α -1-antitripszin vagy a disztropin génje. Az idegen, cirkuláris DNS lehet például egy olyan vektor vírus, amelyet már alkalmaztak szomatikus génterápiás célokra. A vektor sejtspecifikus is lehet, azaz csak olyan sejteket fertőz, amelyekben a génterápiás beavatkozás kívánatos; ilyenek lehetnek a tüdőhám sejtjei, a csontvelő őssejtjei, a T- és B-limfociták, a máj-, vese-, ideg- vagy harántcsíkolt izomsejtek, a vérképzés őssejtjei vagy a fibroblasztok. A szakemberek tudják, hogy a terápiás gének és a célsejtek fenti felsorolása csak példaértékű, és más gének és célsejtek is kiválaszthatók a génterápiára. A génfragmentumok lehetnek például terápiás génekből kivágott részek, önálló exonok, antiszensz nukleinsav-szekvenciák vagy ribozimek. A génfragmentumok tartalmazhatnak olyan génszegmentumokat is, amelyek egy gén, például a törékeny-X szindróma génjének trinukleotid-ismétlései.

Ha egy rekombinációban a vad típusú integrázt alkalmazzuk, akkor az IHF-nek is jelen kell lennie. Előnyös ezért egy módosított integrázt alkalmazni, amellyel a rekombináció az IHF nélkül is végbemegy. Különösen előnyös az Int-h vagy az Int-h/218 alkalmazása.

Így tehát találmányunk tárgyához tartozik a természetes attP szekvencia, illetve annak származékai és homológjai. A találmány tárgyát képezi különösen az 5. számú szekvenciavázlatban meg-

adott *attP** nukleinsav-szekvencia. A találmány tárgyához tartozik továbbá egy vektor, amely a természetes *attP* szekvenciát vagy származékát, különösen az *attP** nukleinsav-szekvenciát és egy további nukleinsav-szekvenciát hordoz, ami egy terápiás gén vagy génfragmentum. Előnyös az a vektor, amelyben a terápiás gén a CFTR-gén, az ADA-gén, az LDL-receptor génje, az α - vagy β -globin génje, az α -1-antitripszin génje, a VIII. vagy IX. faktor génje, vagy ezek egy fragmentuma. A vektor tartalmazhat regulációs DNS-elemeket is a terápiás gén vagy génfragmentum expressziójának szabályozása céljából.

A találmány tárgyat képezi továbbá a vektor gyógyszerként való alkalmazása a humán és állatgyógyászatban. A találmány tárgyat képezi továbbá a vektor alkalmazása szomatikus génterápia céljára szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

A találmány szerinti vektorok például intravénás vagy intramuszkuláris injekciókban adhatók be, de bejuttathatók aeroszolak alakjában is. Másféle alkalmazások is maguktól értetődőek a szakemberek számára.

PÉLDÁK

1. Expressziós és szubsztrát-vektorok előállítása

1.1. Expressziós vektorok

A vad típusú Int (pKEXInt), az Int-h (pKEXInt-h), az Int-h/218 (pKEXInt-h/218) és a pEL13 eukarióta expressziós vektorok a pKEX-2-XR vektor származékai [Ritter és munkatársai, *Methods Mol. Cell. Biol.* 2, 176 (1991)]. Az említett vektor tartalmazza a humán citomegália vírus promoterét (CMV), valamint a simianvírus 40 (SV-40) tumorantigénjének RNS-hasítási és poliadenilációs

szignálelemeit. Az Int gént PCR-val klónozzuk az alábbi primerek segítségével:

(3343) 5' -GCTCTAGACCACCATGGGAAGAAGGCGAAGTCA-3', az Int gén 5' -végénél helyezkedik el, és

(3289) 5' -AAGGAAAGCGGCCGCTCATTATTTGATTTTCATTTTGTCC-3', az Int gén 3' -végénél helyezkedik el. A sokszorosítás ciklusa a következő: bevezető denaturációs lépés (95 °C, 4 perc), utána 30 ciklusban denaturálás (95 °C, 45 s), primerhez kötődés (55 °C, 45 s) és DNS-szintézis (72 °C, 2 perc), majd a befejező lépés (72 °C, 4 perc). Az így kapott fragmentumot klónozzuk a pKEX-2-XR vektorba az XbaI és NotI restrikciós nukleázokkal. Az Int-h templátját a pHN16 vektorból nyerjük [Lange-Gustafson és Nash, *J. Biol. Chem.* 259, 12724 (1989)]. A vad típusú Int és az Int-h/218 mutáns templátjait rendre a pTrcInt és pTrcInt-h/218 vektorokból állítjuk elő [Christ és Dröge, *J. Mol. Biol.* 288, 825 (1999)]. A pEL13 vektor az Int-h gén mellett az attP* egy másolatát is tartalmazza.

Az attP* szekvenciát az attP-ből kiindulva, PCR mutagenézissel készítjük el. Ehhez az alábbi oligonukleotidokat használjuk:

(03) 5' -G TTCAGCTTTT TGATACTAAGTTG-3' ,

(04) 5' -CAACTTAGTATCAAAAAGCTGAAC-3' ,

(PC) 5' -TTGATAGCTCTTCCGCTTCTGTACAGGTCACTAATACC-3' , és

(PD) 5' -ACGGTTGCTCTTCCAGCCAGGGAGTGGGACAAAATTGA-3' .

A sokszorozó ciklus a következő: bevezető denaturációs lépés (95 °C, 4 perc), utána 30 ciklusban denaturálás (95 °C, 45 s), primerhez kötődés (57 °C, 90 s) és DNS-szintézis (72 °C, 90 s), majd a befejező szintézis (72 °C, 4 perc). A PCR termékét a Sapi

restrikciós enzimmel inkubáljuk és a SapI-gyel felnyitott pKEXInt-h vektorba ligáljuk. A pKEX kontroll plazmid nem tartalmazza az Int génjét.

1.2. Szubsztrát-vektorok

A szubsztrát-vektorok a pEGFP plazmid (Clontech) származékai. A rekombinációs keret a CMV promoter szabályozása alatt áll, ami garantálja az erős, konstitutív expressziót. A pGFBattB/attP plazmidot úgy szerkesztjük meg, hogy kivágjuk a GFP (zöld fluoresszkáló fehérje) génjét a pEGFP plazmidból az AgeI és a BamHI restrikciós enzimekkel. A vad típusú attB szekvenciát kettős szálú oligonukleotid-szekvenciaként inszertáljuk az AgeI enzimmel felnyitott vektorba az alábbi oligonukleotidok használatával:

(B10B) 5' –CCGGTTGAAGCCTGCTTTTTTATACTAACTTGAGCGAACGC–3', és

(B10B) 5' –AATTGCGTTCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCAGGCTTCAA–3'.

A vad típusú attP-szekvenciát PCR-val sokszorozítjuk a pAB3 vektorból [Dröge és Cozzarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6062 (1989)] az alábbi primerekkel:

(p7) 5' –TCCCCCGGGAGGGAGTGGGACAAAATTGA–3', és

(p6) 5' –GGGGATCCTCTGTTACAGGTCACTAATAC–3'.

A sokszorozó ciklus a következő: bevezető denaturációs lépés (95 °C, 4 perc), utána 30 ciklusban denaturálás (95 °C, 45 s), primerhez kötődés (72 °C, 30 s) és DNS-szintézis (72 °C, 30 s), majd a befejező szintézis (72 °C, 4 perc). Az attP-szekvenciát hordozó PCR-fragmentumot az XmaI és BamHI enzimekkel emésztjük és összekapcsoljuk egy, a GFP génjét hordozó restrikciós fragmentummal. Az utóbbi restrikciós fragmentumot a pEGFP plazmidból

vágjuk ki az AgeI és EcoRI enzimekkel. Az összekapcsolás termékét az MfeI/BamHI enzimekkel felnyitott, az attB szekvenciát hordozó vektorba klónozzuk. Az így kapott szubsztrát-vektor a CMV-promoterhez képest fordított irányultságban tartalmazza a GFP génjét, aminek működőképességét az egyesítő rekombinációban a vad típusú Int enzimmel, *E. coli*-ban ellenőrizzük.

A rekombinációs szekvenciáktól eltekintve a pGI/attL/attR azonos a pGFPattB/attP vektorral. A vektort úgy készítjük el, hogy először rekombináljuk a pGFPattB/attP-t *E. coli*-ban, ami az attL és attR szekvenciák megjelenéséhez vezet. Ezt követően a CMV-promoterhez képest egyenes irányultságú GFP gént részleges restrikcióval kivágjuk a BsiEI és HindIII enzimekkel. A GFP gént előbb PCR-val sokszorozzuk az alábbi primerekkel, majd a CMV-promoterhez képest fordított irányban beépítjük:

(p2) 5' –AATCCGCGGTCGGAGCTCGAGATCTGAGTCC–3' , és

(p3) 5' –AATCCCAAGCTTCCACCATGGTGAGCAAGGG–3' (3. ábra).

A sokszorozó ciklus a következő: bevezető denaturációs lépés (95 °C, 4 perc), utána 30 ciklusban denaturálás (95 °C, 45 s), primerhez kötődés (56 °C, 45 s) és DNS-szintézis (72 °C, 1 perc), majd a befejező szintézis (72 °C, 4 perc). A PCR-fragmentumot a HindIII és BsiEI enzimekkel elvágjuk, majd beépítjük a részlegesen felnyitott vektorba, ami fordított irányultsággal tartalmazza az attL és attR szekvenciákat. Így tehát a pGFPattL/attR általános szerkezete megegyezik a pGFPattB/attP szerkezetével, azzal az eltéréssel, hogy az attL/attR szekvenciák vannak az attB/attP szekvenciák helyén.

Az attB humán homológját, az attH szekvenciát tisztított em-

beri DNS-ből sokszorozítjuk PCR-val, az alábbi primerek használatával:

(B3) 5' –GCTCTAGATTAGCAGAAATTCTTTTTG–3' , és

(B2) 5' –AACTGCAGTAAAAAGCATGCTCATCACCCC–3' .

A sokszorozó ciklus a következő: bevezető denaturációs lépés (95 °C, 5 perc), utána 30 ciklusban denaturálás (95 °C, 45 s), primerhez kötődés (42 °C, 105 s) és DNS-szintézis (72 °C, 105 s), majd a befejező szintézis (72 °C, 10 perc). Az attH elkészítéséhez használt primer szekvenciákat egy EST-ből vettük (elérési szám: N31218; EMBL-adatbázis). Az adatbázisban hiányosan található attH-szekvenciát az izolált PCR-termék (192 bp) szekvenálásával igazoltuk és kiegészítettük. Ezt követően a fragmentumot az XbaI és PstI enzimekkel emésztjük és beépítjük a megfelelően előkezelt pACYC187 vektorba (New England Biolabs). Az attP*-t a már leírt, irányított mutagenézissel állítjuk elő és az attH-t hordozó vektorba inszertáljuk az attH-hoz képest fordított irányultsággal. Ez a szerkesztés vezet a pACH kísérleti vektorhoz.

A plazmid-DNS-t az *E. coli* DH5α törzséből [Hanahan, *J. Mol. Biol.* 166, 557 (1983)], affinitás-kromatográfiával (Qiagen, NSZK) izoláljuk. Az expressziós és szubsztrát-vektorokat, valamint az összes, PCR-val készített szerkezetet fluoreszcencia-alapú 373A DNS-szekvenáló rendszerrel (Applied Biosystems) ellenőrizzük. A PCR-kat a „Master Mix Kit” készlettel végezzük (Quiagen, NSZK), és a termékeket agarózgél-elektroforézissel (0,8 tömeg/térfogat %, TBE puffer) analizáljuk.



2. Sejttenyésztés és a riporter sejtvonalak létrehozása

Az időleges expressziót és rekombinációs analízist humán Burkitt-limfóma sejtvonalon [BL60; Wolf és munkatársai, Cancer Res. 50, 3095 (1990)] végezzük. A BL60 sejteket RPMI1640 tápoldatban (Life Technologies, Inc.) tenyésztjük, amit 10 % magzati borjúsérummal, 2 mM L-glutaminnal, 0,1 mg/ml sztreptomocinnal és 100 U/ml penicillinnel egészítettünk ki.

A BL60 riporter sejtvonalakokat – amelyek genomjába stabilan beépült a pGFPattB/attP vagy a pGFPattL/attR vektor – az alábbi módon állítjuk elő: a vektorok körülbelül 20 µg-ját ApaLI-vel linealizáljuk, fenol/kloroform elegyes extrakcióval tisztítjuk, etanollal kicsapjuk és körülbelül 2×10^7 sejtbe juttatjuk be elektroporáció útján (Bio-Rad Gene Pulser, 260 V, 960 mF). A stabil sejtvonalakokat G418/Genezitin-nel (300 µg/ml) szelektáljuk, majd PCR-val, DNS-szekvenálással és Southern-analízissel jellemezzük.

3. In vivo rekombináció analízis

Az intramolekuláris rekombináció *in vivo* megvalósításához a megfelelő BL60 riporter sejtvonalból körülbelül 2×10^7 sejtet transzfektálunk 40 µg cirkuláris expressziós vektorral, a 2. pontban leírt módszerrel. A sejteket 72 óra múlva, centrifugálással összegyűjtjük, fele mennyiségükből izoláljuk a genomiális DNS-t affinitás-kromatográfiával, a gyártó utasításai szerint (Qiaamp Blood Kit, Qiagen, NSZK). A sejttömeg másik feléből vagy az RNS-t izoláljuk (Rneasy Kit, Qiagen, NSZK), vagy lizátumot készítünk a Western-analízis céljára (lásd 4. példa).

A rekombinációs analízist a pACH vektorral *E. coli*-ban vé-

gezzük Christ és Dröge (*id. közl.*) szerint, az Int, Int-h és Int-h/218 rekombinázoikat használva. A pACH elvárt rekombinációja egy inverzióhoz vezet, ami a HindIII és AvaI enzimekkel elvégzett rekombinációs analízissel ellenőrizhető.

Az intermolekuláris rekombinációt, amivel a pEL13 vektort beépítjük a BL60 sejtek genomjában található attH lókuszbba, az alábbi módon végezzük: 2×10^7 sejtet transzfektálunk 20 μg körkörös pEL13 vektorral, a fent leírt elektroporációval. A sejteket 1×10^6 sejt/ml sűrűségben szélesztjük egy szelekciós tápközegben (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ higromicin B) 48 óra múlva, majd 6 - 8 héten át inkubáljuk. Ezután a túlélő sejtpopulációk egy részéből a fent leírt módon izoláljuk a genom-DNS-t.

Az intramolekuláris integráló és kivágó rekombinációk ellenőrzéséhez 0,4 μg genom-DNS-t sokszorozunk 20 - 50 pmól primerrel az alábbiak közül:

- (p1) 5' -GGCAAACCGGTTGAAGCCTGCTTTT-3' ,
- (p2) 5' -AATCCGCGGTCGGAGCTCGAGATCTGAGTCC-3' ,
- (p3) 5' -AATCCCAAGCTTCCACCATGGTGAGCAAGGG-3' ,
- (p4) 5' -AACCTCTACAAATGTGGTATGG-3' ,
- (p5) 5' -TACCATGGTGATGCGGTTTTG-3' ,
- (p6) 5' -GGGGATCCTCTGTACAGGTCACATAATAC-3' ,
- (p7) 5' -TCCCCCGGGAGGGAGTGGGACAAAATTGA-3' .

A sokszorozó ciklus a következő: bevezető denaturációs lépés (95 °C, 5 perc), utána 30 ciklusban denaturálás (95 °C, 45 s), primerhez kötődés (57 °C, 45 s) és DNS-szintézis (72 °C, 90 s), majd a befejező szintézis (72 °C, 4 perc).

A pEL13 intermolekuláris beépülési rekombinációját az aláb-

biak szerint mutatjuk ki. A túlélő sejtpopulációkból izolált genom-DNS körülbelül 400 ng-ját az alábbi oligonukleotid primerekkel inkubáljuk:

(attx1) 5' -AGTAGGAATTCAGTTGATTCATAGTGACTGC-3' , és

(B2) 5' -AACTGCAGTAAAAAGCATGCTCATCACCCC-3' .

A sokszorozó ciklus a következő: bevezető denaturációs lépés (95 °C, 4 perc), utána 30 ciklusban denaturálás (95 °C, 45 s), primerhez kötődés (52 °C, 45 s) és DNS-szintézis (72 °C, 45 s), majd a befejező szintézis (72 °C, 4 perc).

A reverz transzkriptáz polimeráz láncreakciót (RT-PCR) 4 µg izolált RNS-sel végezzük el. Először a cDNS-eket szintetizáljuk oligo-dT primereket használva a gyártó utasításai szerint (First Strand Synthesis Kit, Pharmacia). Második lépésként az említett cDNS negyed részét használjuk templátként a PCR-hoz, amit a p3 és p4 primerekkel végzünk. A kivágás vizsgálatához az izolált genom-DNS-t a p5 és p6 primerekkel sokszorozzuk. A β-aktin transzkriptumait az említett cDNS-ből kiindulva, az alábbi primerek felhasználásával analizáljuk:

(AS) 5' -TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' , és

(S) 5' -TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' .

A PCR körülményei megegyeznek a p1 - p7 primerekkel végzettével.

A Southern-analízist lényegében Sambrook leírása szerint végezzük („*Molecular Cloning*”, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Körülbelül 10 µg genom-DNS-t NcoI-vel fragmentálunk, a fragmentumokat agarózgél-elektroforézissel, TBE pufferben elválasztjuk és nejlonmembránra visszük át egy éjszaka

alatt. A rekombináció kimutatásához szükséges GFP-szondát PCR-val állítjuk elő a p2 és p3 primerek felhasználásával. A radioaktív jelölést ^{32}P -t tartalmazó dATP-vel és dCTP-vel végezzük a gyártó utasításai szerint (Megaprime, Amersham).

4. Western-analízis

A transzfektált sejtek lizátumát úgy készítjük el, hogy a sejteket a vizsgálat pufferében (New England Biolabs), 5 percen át forraljuk. A fehérjéket 12,5 %-os SDS-poliakrilamid gélen molekulatömegük szerint szétválasztjuk és nitrocellulóz membránra (Immobilion P, Millipore) visszük át egy éjszaka alatt. A membránt 1 %-os rögzítő oldattal (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit, Boehringer Mannheim, NSZK) kezeljük, majd a vad típusú Int elleni poliklonális egér-antitest 1:50000 hígítású oldatával inkubáljuk (az antitest A. Landy-tól származott). A peroxidázzal kapcsolt második antitestet használjuk az integráz láthatóvá tételére a gélben. A vad típusú Int-t tartalmazó *E. coli* kivonatot használjuk kontrollként.

5. Eredmények

5.1. Az Int-h szintézise BL60 sejtekben

Ha meg kívánjuk vizsgálni, hogy az Int-h képes-e rekombinációt katalizálni emberi sejtekben, akkor először azt kell kimutatnunk, hogy a rekombináz szintetizálódik az említett sejtekben. Ennek érdekében az Int-h gént a CMV promoter ellenőrzése alatt tartalmazó pKEXInt-h eukarióta expressziós vektort integráltuk a sejtek genomjába. Miután a pKEXInt-h vektort két külön-



böző BL60 riporter sejtvonalba (B2 és B3) integráltuk, a RT-PCR analízissel kimutattuk az Int-h gén teljes és megfelelően módosított transzkriptumait. A sejtek lizátumát Western-analízissel vizsgáltuk 72 órával a pKEXInt-h elektroporációja után. A rekombináz kimutatását a vad típusú Int elleni, poliklonális egér-antitesttel végeztük. A pKEX vektort kontrollként juttattuk sejtekbe.

Az eredmények azt mutatják, hogy egy elvárt molekulatömegű fehérje van jelen azokban a sejtekben, amelyekbe a pKEXInt-h vektort juttattuk elektroporációval. Az említett fehérje nem volt kimutatható a kontroll pKEX vektorral transzfektált sejtekben.

5.2. Int-h által katalizált beépüléssel intramolekuláris rekombináció humán sejtekben

A Western-analízissel kimutattuk, hogy az Int-h fehérje szintetizálódik a pKEXInt-h vektorral transzfektált két riporter sejtvonalba. Az említett sejtek tartalmazzák a pGFPattB/attP szubsztrát-vektort, mint a genomjukba stabilan integrált idegen DNS-t. A beépüléssel rekombinációhoz szükséges két rekombinációs szekvencia, nevezetesen az attB és attP, egymáshoz képest fordított irányultságúak és a GFP génjének két végéhez csatlakoznak. Maga a GFP gén fordított irányultságú a CMV promoterhez képest, ami az attB-től felfelé helyezkedik el. Az Int-h által végrehajtott rekombináció az attB és attP között a GFP gén átfordulását és ezáltal expresszióját eredményezi. Összesen három riporter sejtvonalat (B1, B2 és B3) készítettünk. A genom-DNS Southern-analízissel kimutattuk, hogy a pGFPattB/attP vektor számos másolata – mint közvetlen ismétlődések – integrálódott a B1 és B3

sejtvonalak genomjaiba, míg a B2 sejtvonalában csak egyetlen másolat volt. A beépült szekvenciákat PCR-val és szekvenálással igazoltuk.

Az *attB* és *attP* közötti rekombináció vizsgálatához a pKEXInt-h és pKEX vektorokat külön juttattuk be a sejtvonalakba. A sejteket az elektroporáció után 72 órával összegyűjtöttük és a GFP expresszióját RT-PCR-val, a p3/p4 primer pár használatával vizsgáltuk. Az említett primereket csak egy 990 bp hosszúságú DNS-fragmentummá sokszoroztuk, ha a gén a rekombináció következtében átfordult. A termék mindhárom sejtvonalban kimutatható volt. Ha a sejt a pKEX vektorral volt transzformálva, a termék nem volt kimutatható. Az izolált PCR-termékek szekvencia-analízise megerősítette, hogy a GFP fénje átíródott, és az *attP* helyett az *attB* volt kimutatható a transzkriptumban. A β -aktin transzkriptumát – amely az RNS mennyiségének és a DNS első szála eredményes szintézisének kontrollja – PCR-val vizsgáltuk és azt találtuk, hogy a transzkriptum mind a hat sejtpreparátumban, közel azonos mennyiségben van jelen.

A rekombinációt a genom-DNS közvetlen sokszorozásával is kimutattuk. Az elvárt termékek csak a p3/p4 (990 bp) és a p1/p2 (920 bp) primer párok használatával voltak kimutathatók, ha a sejtek a pKEXInt-h vektorral voltak transzfektálva. Az említett termékek DNS-szekvenálással elvégzett analízise megerősítette, hogy az *attR* és az *attL* jelen vannak a genomban, és a GFP gén átfordult a rekombináció során. Ezeket a kísérleteket háromszor megismételtük, és az *attB* és *attP* közötti rekombináció mindhárom sejtvonalban kimutatható volt RT-PCR-val és/vagy PCR-val. A GFP

gén kivágásának kimutatására végzett PCR negatív eredményt adott a p5/p6 primer párral; csak az elvárt, 1,3 kbp fragmentum – ami a beépült vektorból származott – sokszorozódott.

Az erősebb jelet – ami az attB és attP közötti inverzióra utal a PCR-ban – ismételten megkaptuk a B3 sejtvonallal egy további kísérletben. A genom-DNS-t NcoI-vel fragmentáltuk és Southern-analízissel vizsgáltuk szondaként a GFP génjét használva. Így kimutattuk, hogy a B3 sejtvonalba jelen van a genom-DNS azon restrikciós fragmentuma, amely elvárható az attB és attP közötti átfordulás következményeként.

Annak eldöntésére, hogy a vad típusú Int és mutáns Int-h/218 képesek-e intramolekuláris beépülési rekombinációt katalizálni, a pKEXInt-h, pKEXInt-h/218 és pKEXInt vektorokat, valamint a kontroll pKEX vektort juttattuk egy további kísérletben, a fent leírt elektroporációs eljárással a B3 riporter sejtvonalba. A genom-DNS-t 72 óra múlva izoláltuk és a rekombinációra vizsgáltuk PCR-val, a p5/p7 és p3/p4 primer párokkal, a 3. pontban leírt módon. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét mutáns Int katalizálta a rekombinációt az attB és attP között, míg a vad típusú Int inaktív volt.

5.3. Kivágó rekombináció az attL és attR között nem volt kimutatható

Mivel az Int-h képes a kivágó rekombináció katalizálására az attL és attR között az IHF és Xis faktorok hiányában is, három BL60 riporter sejtvonalat hoztunk létre, amelyek genomjába stabilan beépült a pGFPattL/attR vektor. Az említett sejtvonalak szintén fordított irányultsággal tartalmazzák a GFP génjét a CMV

promoterhez képest, de a gén végeihez az *attL* és *attR* szekvenciák csatlakoznak az *attB* és *attP* helyett. A rekombinációs analízist a pKEXInt-h vektorral, mint expressziós vektorral hajtottuk végre a 3. pontban leírt módon, az eredmények azonban azt mutatták, hogy sem átfordulás, sem kivágás nem történt az *attL* és *attR* rekombinációs szekvenciák között.

5.4. A humán genomban természetesen előforduló, az *attB*-hez hasonló nukleotid szekvencia azonosítása és jellemzése

Amint a 3. példában kimutattuk, mindkét mutáns Int rekombináza katalizálja a beépítő intramolekuláris rekombinációt emberi sejtekben. A reakcióban szereplő két rekombinációs szekvencia egyike, nevezetesen az *attB*, 21 bp hosszúságú és az *E. coli* genomjának természetes része. Kimutatták, hogy az Int-h tolerálja az *attP*-vel történő rekombinációban, ha bizonyos különbségek vannak az *attB* úgynevezett magfelismerő területén [Nash, *Annu. Rev. Genet.* 15, 143 (1981)]. Statisztikailag valószínű, hogy az emberi genomban található egy, az *attB*-vel funkcionálisan homológ szekvencia. Jelen találmány feltalálói azonosítani tudtak egy még inkomplett szekvenciát egy kifejezett szekvencia-függékben (EST) az adatbázisban folytatott kereséssel. Ezt a szekvenciát humán DNS-ből izolálták és klónozták. A szekvenciát szekvenálással kiegészítették és a BL60 sejtek genom-DNS-én végzett Southern-analízissel kimutatták, hogy az említett szekvencia egy még ismeretlen humán gén része, amely gén egyetlen másolatban van jelen a genomban.

Az említett szekvencia, amelyet *attH*-nak neveztek el, három helyen különbözik a vad típusú *attB* szekvenciától. A nukleotidok

közül kettő az Int magfelismerő terület bal (B) oldalán van, a harmadik az úgynevezett átfedő területen. Mivel a két rekombinációs szekvencia átfedő területeinek egyezősége az Int-h-val végzett rekombináció eredményességének alapfeltétele, a 0. helyzetű nukleotid timidinről guaninra való kicserélése az attP átfedő területén eredményezi az attP* szekvenciát. Az attH és attP* szekvenciákat fordított helyzetben beépítettük egy vektorba (pACH) és a vektort rekombinációra vizsgáltuk *E. coli*-ban. Az eredmények azt mutatták, hogy az Int-h és az Int-h/218 inverziót katalizálnak az attH és attP* között IHF jelenléte nélkül. Az izolált rekombinációs termékek DNS-szekvenciájának analízise megerősítette, hogy az attH és attP* rekombinációs szekvenciák közötti rekombináció az elvárt mechanizmussal ment végbe. Ezzel szemben a vad típusú Int még az IHF jelenlétében is csak igen kis hatékonysággal rekombinálja az attH/attP* szekvenciákat. Így tehát az attH egy potenciális integrációs szekvencia az Int-h katalizálta rekombináció számára, amivel egy idegen DNS, így az attP* egy másolata beépíthető.

5.5. Beépítő intermolekuláris rekombináció az attH és attP* között emberi sejtekben

Elkészítettük a pEL13 plazmidot annak kimutatásához, hogy az attH – mint a humán genom természetes része – képes-e rekombinálódni az attP*-vel egy intermolekuláris reakcióban. Az említett vektor tartalmazza az attP* egy másolatát az Int-h gén mellett – ami a CMV promoter kontrollja alatt áll –, és szelekciós markerként a higromicin-rezisztencia génjét. Miután a pEL13 plazmidot

bejuttattuk a sejtbe, az Int-h szintetizálódott és katalizálta az intermolekuláris rekombinációt a genom attH szekvenciája és a pEL13 plazmid attP* szekvenciája között.

A pEL13 vektort a 2. példában leírt módon, elektroporációval juttattuk a BL60 sejtekbe. Az említett sejteket szelekciós nyomás alá helyeztük, majd 72 óra után felnyitottuk. A túlélő sejtpopulációkat a rekombinációs esemény után 6 - 8 héttel vizsgáltuk PCR-val, az attx1/B2 primer párral. Az eredmények azt mutatták, hogy a 31 túlélő sejtpopulációból 13-ban megtörtént a beépülés az attH-nál. A különböző megközelítésekben származó PCR-termékek szekvencia-analízise megerősítette, hogy azok rekombinációs termékek.

(SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE)
SEQUENZPROTOKOLL

<110> Dröge Dr., Peter

<120> Sequenz-spezifische DNA-Rekombination in eukaryotischen Zellen

<130> DRO-001

<140> xx

<141> 1999-08-30

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

ctgctttttt atactaactt g

21

<210> 2

<211> 243

<212> DNA

<213> Bacteriophage lambda

<400> 2

tctgttacag gtcactaata ccatctaagt agttgattca tagtgactgc atatgttggtg 60
ttttacagta ttatgtagtc tggtttttat gcaaaatcta atttaatatata ttgatattta 120
tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt tatactaagt tggcattata aaaaagcatt 180
gcttatcaat ttgttgcaac gaacaggtca ctatcagtca aaataaaatc attatttgat 240
ttc 243

<210> 3

<211> 102

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

ctgctttttt atactaagtt ggcattataa aaaagcattg cttatcaatt tgttgcaacg 60
aacaggtcac tatcagtcaa aataaaatca ttatttgatt tc 102

<210> 4

<211> 162

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

```
tctgttacag gtcactaata ccatctaagt agttgattca tagtgactgc atatgttgtg 60
ttttacagta ttatgtagtc tgttttttat gcaaaatcta atttaataata ttgatattta 120
tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt tataactaact tg 162
```

<210> 5

<211> 243

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 5

```
tctgttacag gtcactaata ccatctaagt agttgattca tagtgactgc atatgttgtg 60
ttttacagta ttatgtagtc tgttttttat gcaaaatcta atttaataata ttgatattta 120
tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt gataactaagt tggcattata aaaaagcatt 180
gcttatcaat ttgttgcaac gaacagggtca ctatcagtca aaataaaatc attatttgat 240
ttc 243
```

S Z A B A D A L M I I G É N Y P O N T O K

1. Eljárás DNS szekvencia-specifikus rekombinálására egy eukarióta sejtben, azzal jellemezve, hogy az eljárás az alábbi lépéseket foglalja magában:

a) egy első DNS-szekvencia bejuttatása egy sejtbe, ahol az említett DNS-szekvencia tartalmaz egy, az 1. számú szekvenciavázlat szerinti attB szekvenciát vagy annak egy származékát; egy, a 2. számú szekvenciavázlat szerinti attP szekvenciát vagy annak egy származékát; egy, a 3. számú szekvenciavázlat szerinti attL szekvenciát vagy annak egy származékát; vagy egy, a 4. számú szekvenciavázlat szerinti attR szekvenciát vagy annak egy származékát;

b) egy második DNS-szekvencia bejuttatása egy sejtbe, ahol ha az említett első DNS-szekvencia tartalmaz egy, az 1. számú szekvenciavázlat szerinti attB szekvenciát vagy annak egy származékát, akkor az említett második DNS-szekvencia tartalmaz egy, a 2. számú szekvenciavázlat szerinti attP szekvenciát vagy annak egy származékát és megfordítva; vagy ha az említett első DNS-szekvencia tartalmaz egy, a 4. számú szekvenciavázlat szerinti attR szekvenciát vagy annak egy származékát, akkor az említett második DNS-szekvencia tartalmaz egy, a 3. számú szekvenciavázlat szerinti attL szekvenciát vagy annak egy származékát; és

c) a szekvencia-specifikus rekombináció végrehajtása a λ -bakteriofág Int integrázával.

2. Eljárás DNS szekvencia-specifikus rekombinálására egy eukarióta sejtben, azzal jellemezve, hogy a sejt genomja tartal-

mazza az említett első DNS-szekvenciát akár azért, mert az természetesen előfordul az említett eukarióta sejtben, akár azért, mert már korábban, DNS-rekombinációval, az 1. igénypont b) és c) pontja szerinti eljárással be lett juttatva.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett első DNS-szekvencia tartalmaz egy, az 1. számú szekvenciavázlat szerinti attB szekvenciát vagy annak egy származékát, és az említett második DNS-szekvencia tartalmaz egy, a 2. számú szekvenciavázlat szerinti attP szekvenciát vagy annak egy származékát.

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett első DNS-szekvencia tartalmaz egy, a 3. számú szekvenciavázlat szerinti attL szekvenciát vagy annak egy származékát, és az említett második DNS-szekvencia tartalmaz egy, a 4. számú szekvenciavázlat szerinti attR szekvenciát vagy annak egy származékát, és a c) lépésben még egy Xis faktor is részt vesz.

5. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy még egy harmadik, vagy egy harmadik és egy negyedik DNS-szekvenciát – amelyek rendre egy Int gént vagy egy Int gént és egy Xis faktor gént tartalmaznak – is bejuttatunk a sejtbe.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett harmadik vagy az említett harmadik és/vagy negyedik DNS-szekvenciák tartalmaznak még egy regulátor DNS-szekvenciát, amely térben és/vagy időben szabályozza az Int gén és/vagy a Xis faktor expresszióját.

7. Az 1., 2., 3., 4., 5. vagy 6. igénypontok bármelyike

szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett Int egy módosított integráz.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett módosított Int az Int-h vagy az Int-h/218.

9. Az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. vagy 8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a c) lépésben még egy „integrációs gazda-faktor” (IHF) is szerepel.

10. Az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. vagy 9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett első és/vagy második DNS-szekvencia tartalmaz még olyan DNS-szekvenciákat is, amelyek elvégzik az említett első és/vagy második DNS-szekvencia beépítését az eukarióta sejtek genomjába homológ rekombináció útján.

11. Az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9. vagy 10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett első és/vagy második DNS-szekvencia tartalmaz még egy fontos polipeptidet kódoló nukleinsav-szekvenciát is.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett fontos polipeptid egy struktúrfehérje, egy endogén vagy exogén enzim, egy regulátor fehérje vagy egy jelző (marker) fehérje.

13. Az 1. és a 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11. vagy 12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett első és második DNS-szekvenciát ugyanazon a DNS-molekulán juttatjuk be az eukarióta sejtbe.

14. Az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12. vagy 13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jelle-

mezve, hogy az említett eukarióta sejt egy emlős sejt.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett emlős sejt egy ember, majom, egér, patkány, nyúl, hörcsög, kecske, szarvasmarha, juh vagy sertés sejtje.

16. Az 1., 2. vagy 3. és az 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14. vagy 15. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy még az alábbi lépést is magában foglalja:

d) az a) – c) lépések után és egy első szekvencia-specifikus DNS-rekombinációt követően egy második szekvencia-specifikus DNS-rekombináció végrehajtása egy Int integrázzal és egy Xis faktorral, ahol az említett első DNS-szekvencia tartalmazza az említett, az 1. számú szekvenciavázlat szerinti attB szekvenciát vagy egy származékát, és az említett második DNS-szekvencia tartalmazza az említett, a 2. számú szekvenciavázlat szerinti attP szekvenciát vagy egy származékát, vagy megfordítva.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy még egy további DNS-szekvenciát is bejuttatunk az említett sejtekbe, amely további DNS-szekvencia a Xis faktor génjét tartalmazza.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett további DNS-szekvencia olyan regulátor DNS-szekvenciát is tartalmaz, amely az említett Xis faktor génjének expresszióját térben és/ vagy időben szabályozza.

19. Az 1. számú szekvenciavázlat szerinti attB szekvencia vagy egy származéka és egy, a 2. számú szekvenciavázlat szerinti attP szekvencia vagy egy származéka, vagy egy, a 3. számú szekvenciavázlat szerinti attL szekvencia vagy egy származéka és

egy, a 4. számú szekvenciavázlat szerinti attR szekvencia vagy egy származéka alkalmazása DNS szekvencia-specifikus rekombinálásra eukarióta sejtekben.

20. Az 5. számú szekvenciavázlat szerinti nukleinsav-szekvencia vagy egy származéka, amely akár hat szubsztitúciót tartalmaz, azzal a kikötéssel, hogy ez a származék a vad típusú attP szekvenciától eltérő.

21. Vektor, amely a 20. igénypont szerinti, említett nukleinsav-szekvencia mellett egy további, egy terápiás gént kódoló nukleinsav-szekvenciát vagy abból egy DNS-fragmentumot is tartalmaz.

22. A 21. igénypont szerinti vektor, amelyben az említett terápiás gén a CFTR-gén, az ADA-gén, az LDL-receptor génje, a β -globin génje, a VIII. vagy IX. faktor génje, az α -1-antitripszin vagy a disztropin génje, vagy az említett gének egy fragmentuma.

23. A 21. vagy 22. igénypont szerinti vektor, ahol az említett, további nukleinsav-szekvencia további expressziós és/vagy transzkripciós elemeket is tartalmaz.

24. A 21., 22. vagy 23. igénypontok bármelyike szerinti vektor gyógyszerként való alkalmazása a humán vagy állatgyógyászatban.

25. A 21., 22. vagy 23. igénypontok bármelyike szerinti vektor alkalmazása szomatikus génterápiára szolgáló gyógyszer előállítására.

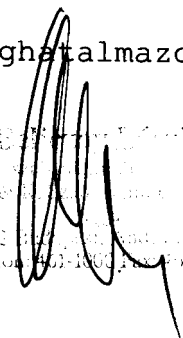
26. Eukarióta sejt, amelyet úgy nyerünk, hogy az 1. vagy 2. igénypont szerinti eukarióta sejtet az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17. vagy 18.

igénypontok bármelyike szerinti eljárásnak vetjük alá.

27. Transzgén szervezet, amely legalább egy 26. igénypont szerinti sejtet tartalmaz.

28. A 28. igénypont szerinti szervezet, amely egy egér, patkány, nyúl vagy hörcsög.

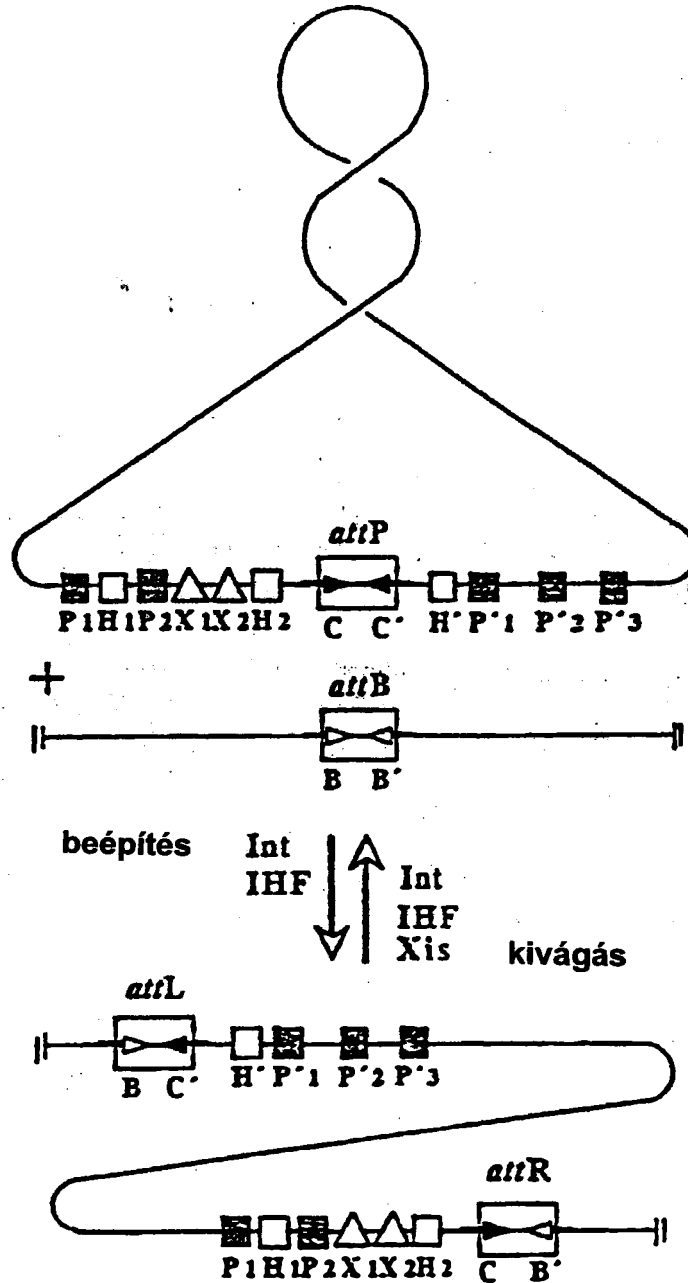
A meghatalmazott:


Dr. János P. Pál
Magyarországi Állam
Ministeriuma
Központi Statisztikai Hivatal
1051 Budapest, Széchenyi tér 1. sz. ép.
Telefon: 461-1000, 461-1020

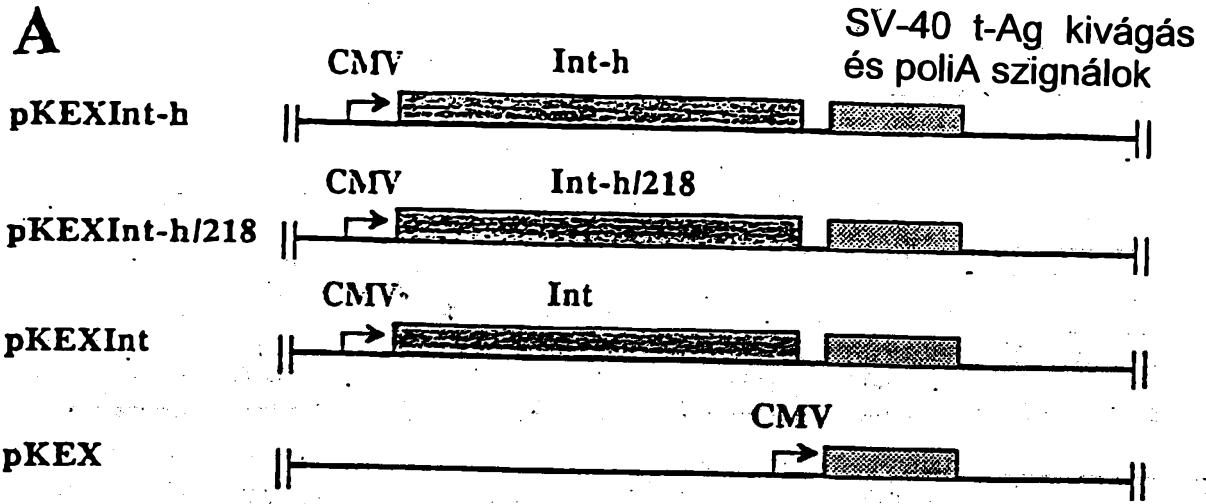
5022. + Pál

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY A2

1. ábra



2. ábra



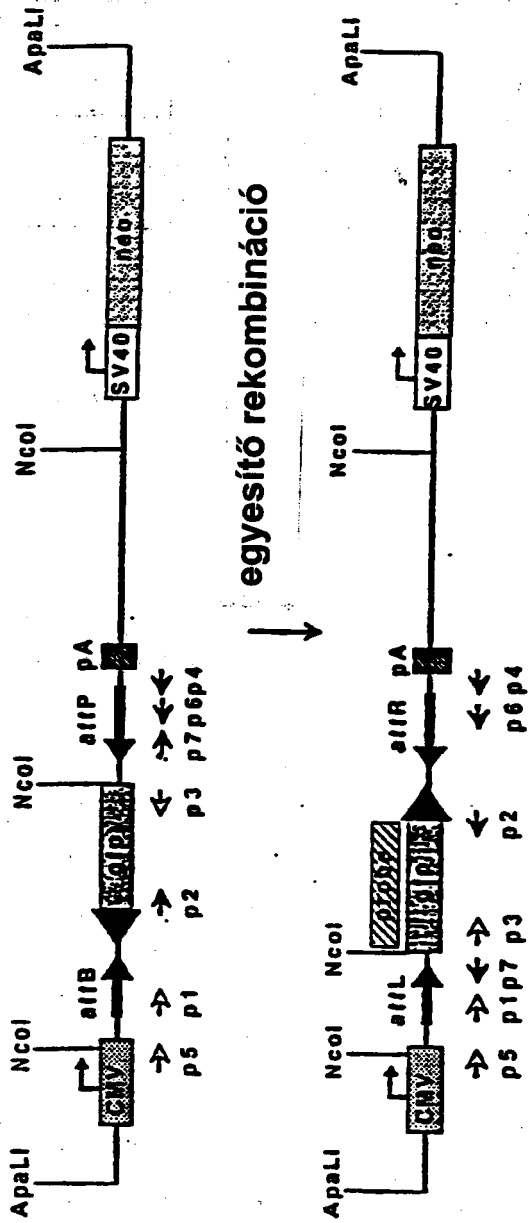
B

sejtvonal	B2	B2	B3	B3		
pKEX	+	-	+	-		
pKEXInt-h	-	+	-	+		
sáv	1	2	3	4		M

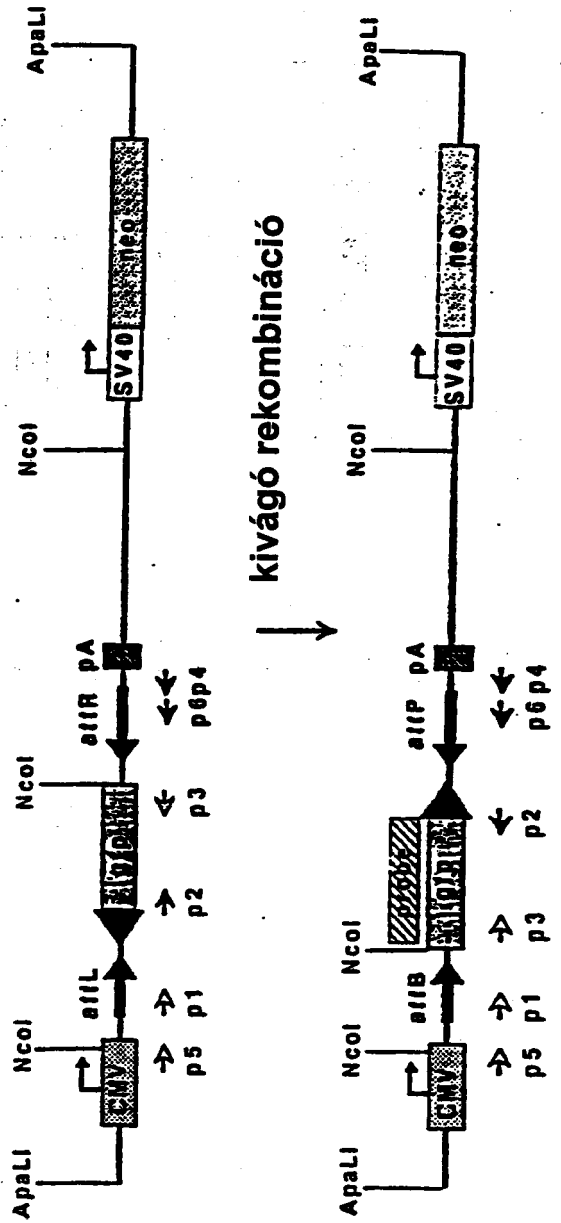
Int →

3. ábra

A pGFPattB/attP

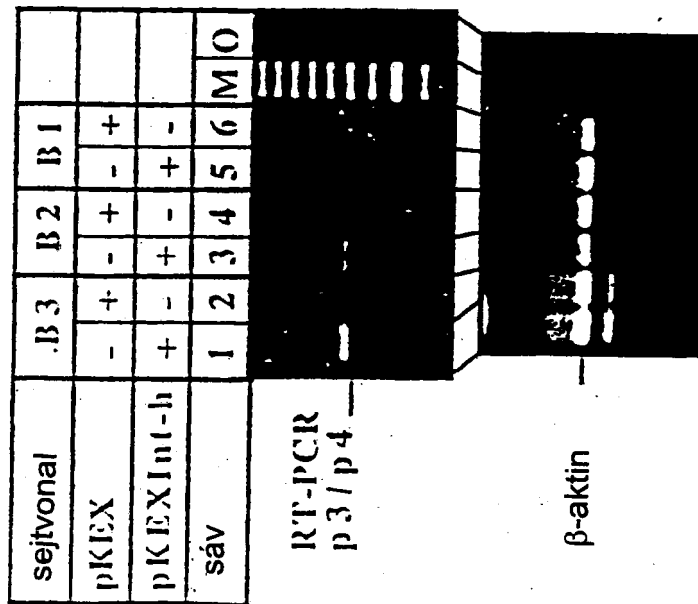


B pGFPattL/attR

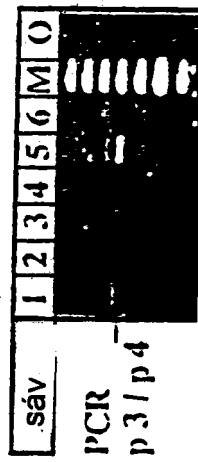


4. ábra

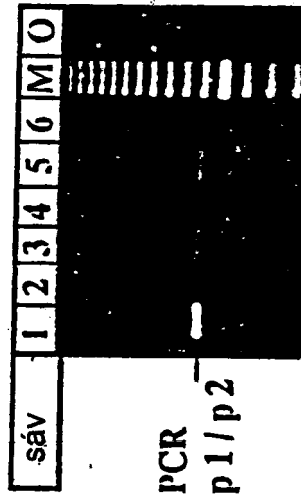
A



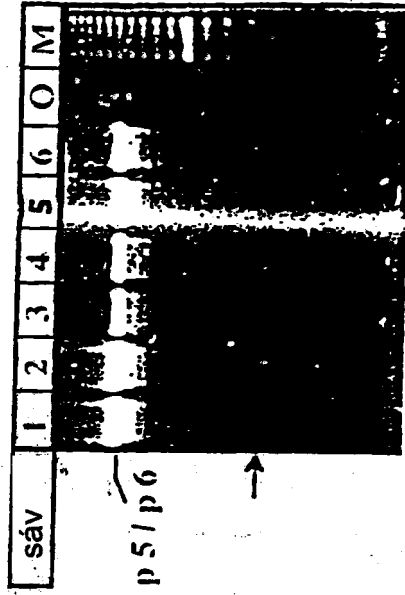
B



C

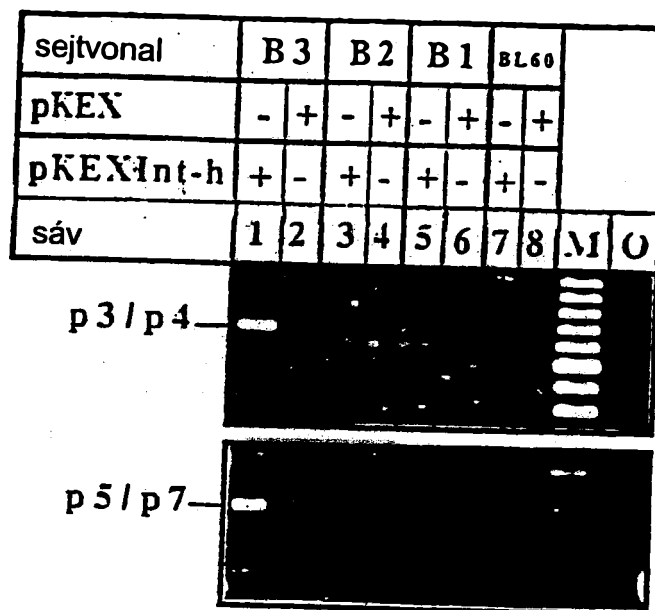


D

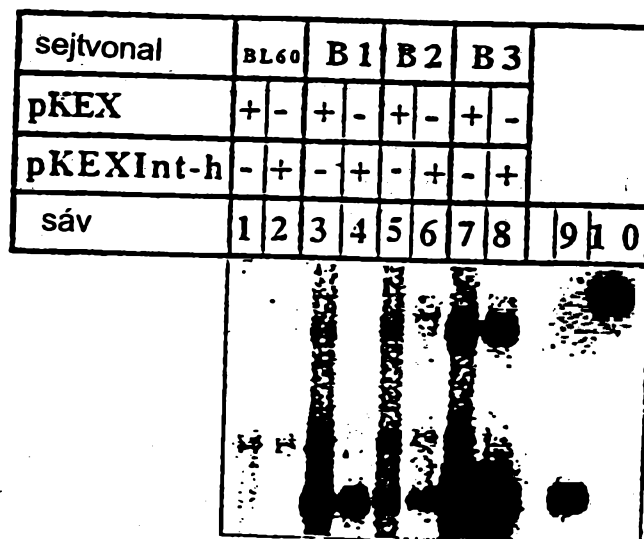


5. ábra

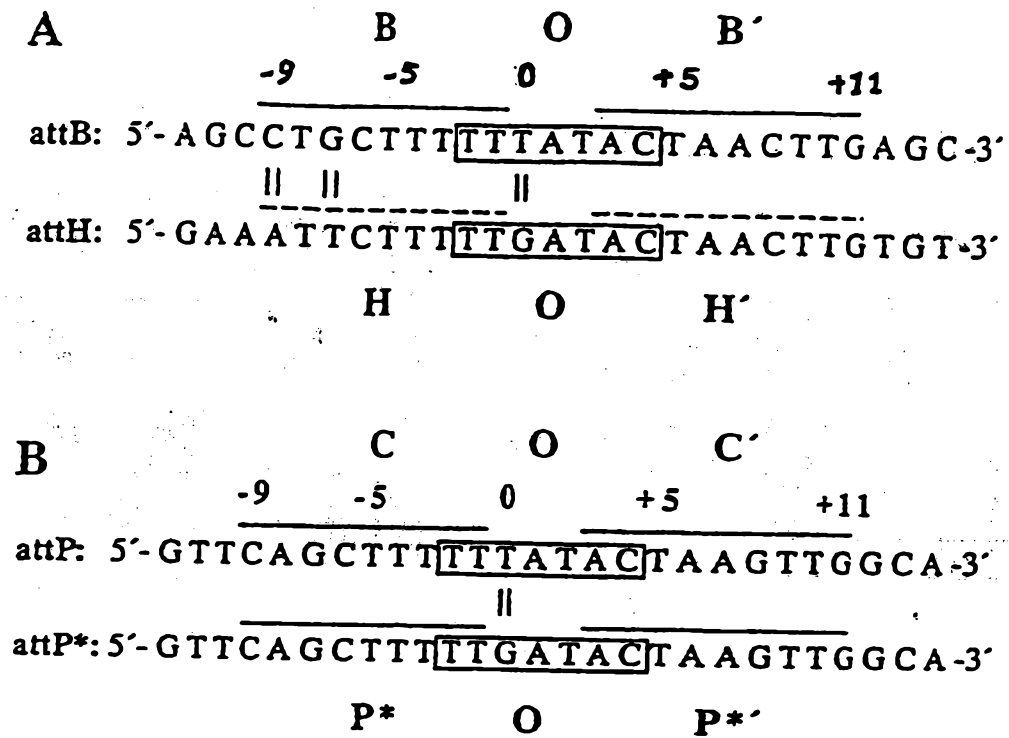
A



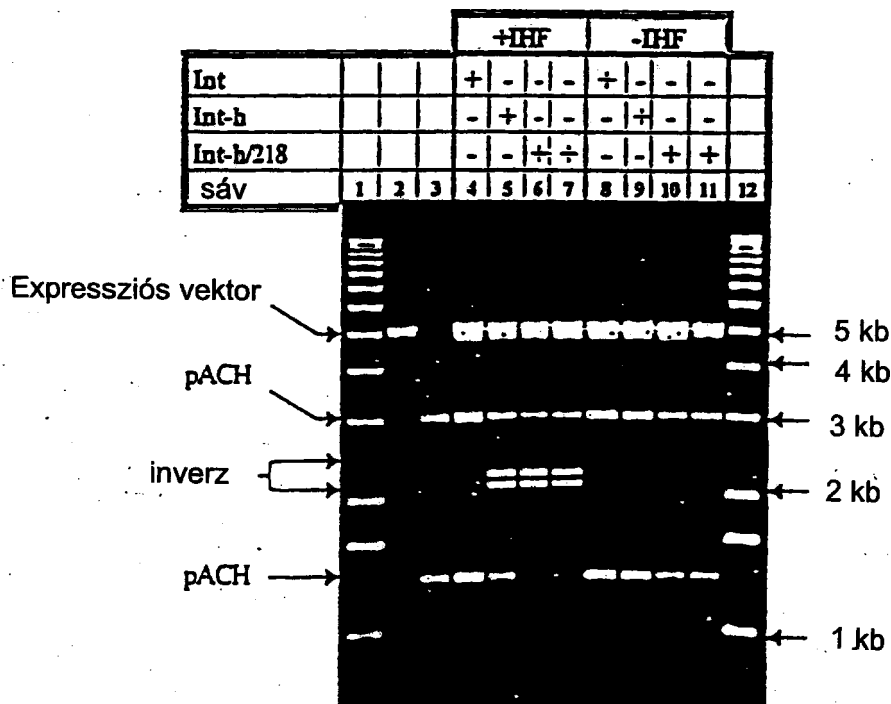
B



6. ábra

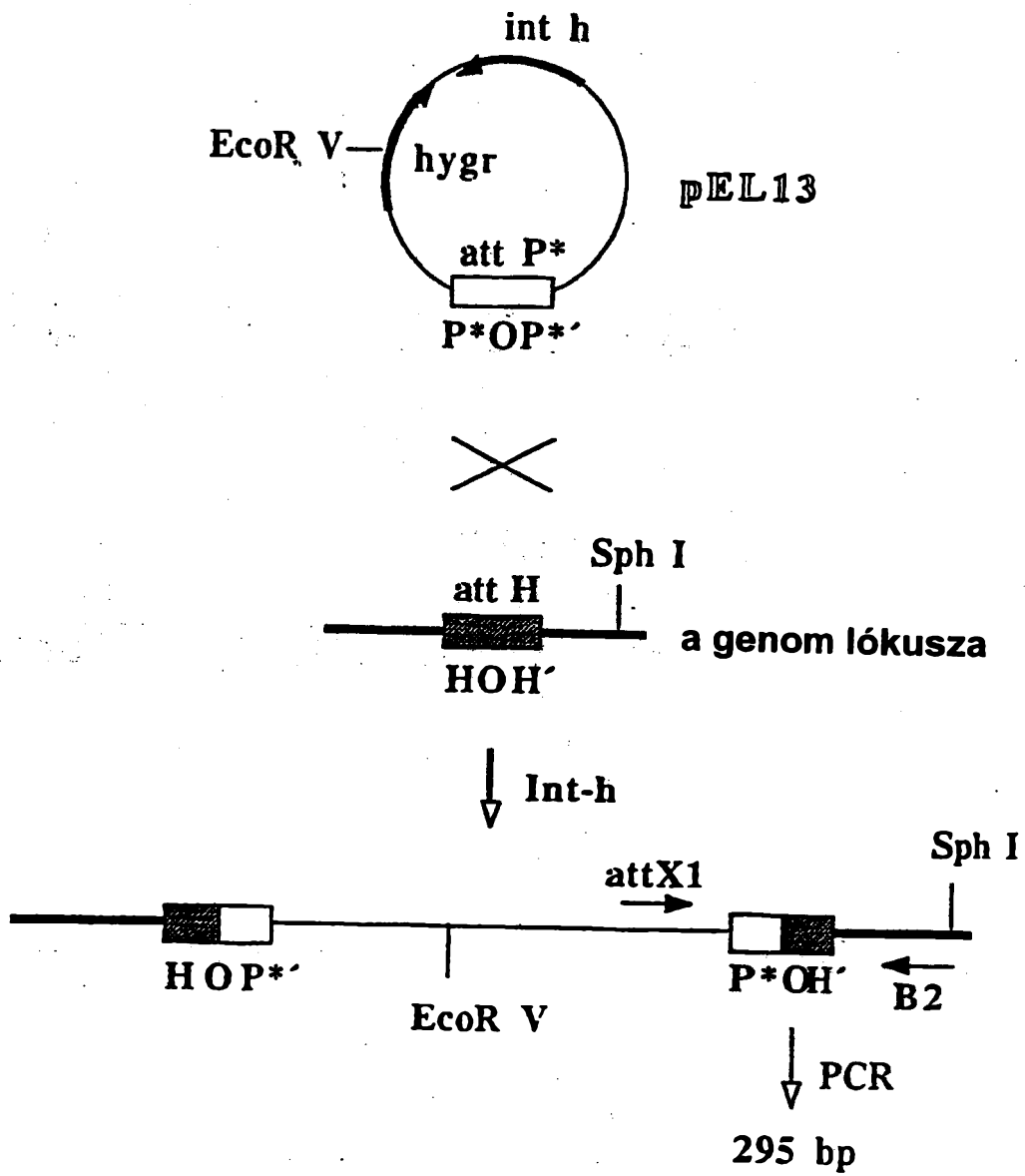


7. ábra



7/8

8. ábra



9. ábra

