

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03808005.2

[51] Int. Cl.

C12N 15/54 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1311080C

[22] 申请日 2003.4.4 [21] 申请号 03808005.2

[30] 优先权

[32] 2002.4.9 [33] IB [31] PCT/IB02/01258

[86] 国际申请 PCT/IB2003/001414 2003.4.4

[87] 国际公布 WO2003/085113 英 2003.10.16

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.9

[73] 专利权人 巴塞尔大学

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 U·A·迈尔 D·J·费拉塞尔

M·R·考夫曼 M·波维内克

A·楚姆旋泰格

[56] 参考文献

WO 9961622A1 1999.12.2

Alternative splicing and tissue – specific transcription of human and rodent ubiquitous 5 – aminolevulinate synthase (ALAS1) genes. Roberts A. G., et al, Biochim. Biophys. Acta., Vol. 1518 2001

Homo sapiens 3p21.1 contig 9 PACRPCI5 – 1157M23 (RoswellPark Cancer Institute Human PACLibrary) complete sequence Muzny D., et al, GenBank accession no. AC006252 1999

Homo sapiens chromosome 3 clone RP11 – 330H6, complete sequence Kaul R. K., et al, GenBank accession no. AC097637 2002

权利要求书 2 页 说明书 36 页 附图 16 页

Homo sapiens chromosome 3 clone RP11 – 758M15 map3, working draft sequence, 64 unordered pieces. Birren B., et al, GenBank accession no. AC044892 2000

Identification of regulatory sequences in the gene for 5 – aminolevulinate synthase from rat. Giovanna Braidotti, et al, J. Biol. Chem., Vol. 268 No. 2 1993

审查员 张 建

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

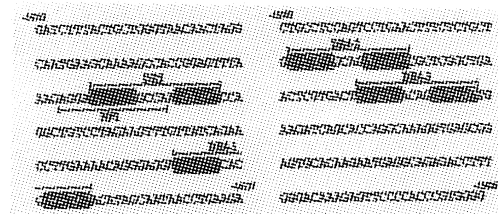
代理人 刘 玥 王景朝

[54] 发明名称

5 – 氨基乙酰丙酸合酶基因的增强子序列

[57] 摘要

本发明公开了介导化合物诱导的 5 – 氨基乙酰丙酸合酶基因 (ALAS1) 表达的核酸序列。所述序列至少包含一个 DR – 4 结合位点。除此以外, 描述了检测用于调节血红素和/或 P450 细胞色素合成的化合物的体外方法。



1. 一种分离的核酸序列，其包含至少一个 DR-4 核受体结合位点，此种结合位点以半位点间用 4 个核苷酸分开的同向重复排列的六聚体半位点为特征，其中所述核酸序列具有 ALAS1 基因转录增强子的功能，前提是所述序列不包括示于 Seq. Id. No. 8 到 10 和 39 的序列。

2. 权利要求 1 的核酸序列，其中所述核酸序列进一步包括核因子 1 结合位点和/或 DR-5 核受体结合位点，其中核因子 1 结合位点具有共有序列 TGGC (N₁) GCCA，其中 N 是任何核苷酸，且 DR-5 核受体结合位点以半位点间用 5 个核苷酸分开的同向重复排列的六聚体半位点为特征。

3. 权利要求 1 或 2 的核酸序列，其中所述核酸序列介导化合物诱导的转录激活。

4. 权利要求 3 的核酸序列，其中所述化合物是用于治疗用途的候选化合物或药物。

5. 权利要求 1 或 2 的核酸序列，其中所述序列是选自 Seq. Id. No. 1-7 的序列。

6. 一种遗传构建体，其包括可操作地与编码报道分子的核酸相连接的权利要求 1-5 中任一项的核酸序列。

7. 权利要求 6 的遗传构建体，其中所述报道分子具有酶活力。

8. 权利要求 7 的遗传构建体，其中所述报道分子的活力能够通过比色、放射性、荧光或化学发光法检测。

9. 权利要求 6-8 中任一项的遗传构建体，其中所述报道分子选自萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、碱性磷酸酶和绿色荧光蛋白。

10. 用于检测调控血红素和/或 P450 细胞色素合成的化合物的方法，其包括将含有权利要求 6-9 的遗传构建体的合适的细胞与待测化合物相接触，并检测编码报道基因的核酸序列的表达和/或转录的增强或抑制。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述化合物是用于治疗用途的候选药物或药物。

12. 权利要求 10 或 11 的方法，其中所述编码报道基因的核酸序

列的表达的增强通过比色、荧光、放射性或化学发光法检测。

13. 权利要求 10 或 11 的方法，其中所述编码报道基因的核酸序列的转录的增强通过定量 PCR 检测。

14. 权利要求 10 或 11 的方法，其中所述细胞是雄性来亨鸡肝细胞瘤细胞、其它肝细胞瘤细胞、猴肾细胞或人肾细胞。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述猴肾细胞是 CV-1 或 COS-1。

16. 权利要求 1-5 中任一项所述核酸序列在检测作为血红素和/或 P450 细胞色素合成调控子的化合物中的用途。

17. 权利要求 6-9 中任一项所述遗传构建体在检测作为血红素和/或 P450 细胞色素合成调控子的化合物中的用途。

5-氨基乙酰丙酸合酶基因的增强子序列

技术领域

本发明涉及 5-氨基乙酰丙酸合酶基因 (ALAS1) 的转录增强子和作为血红素和/或 P450 细胞色素合成诱导子的化合物的检测方法。

背景领域

人被暴露于饮食、环境以及诊所所开的药物中 (如利福平和苯巴比妥) 的许多外源化合物 (xenobiotics) 中。相应于这种暴露, 哺乳动物已经进化出了诱导涉及解除外源化合物毒性的蛋白质的机制。通过 I 相酶, 特别是含血红素的单加氧酶细胞色素 P450 的代谢经常是抵御这种外源化合物的第一防线。这些解毒酶的活力导致了治疗药物有限的体内半衰期, 从而限制了疗效的持续。

通过药物和化学药品的药物代谢酶的诱导包括将药物转变为没有活性的、活性的或有毒的代谢物, 具有重要的临床意义。这些意义包括药物-药物相互作用和某些疾病的急剧缓解, 如肝卟啉症。通过药物、化学药品、激素和营养品诱导 5-氨基乙酰丙酸合酶是肝卟啉症急性发作的一个特点, 该症是一种少见的具有神经精神病症状急性发作特征的遗传代谢疾病。

因此, 在开发新的治疗药物的过程中, 值得筛选所述具有诱导解毒酶能力的新的活性化合物。

现有技术描述的检测方法允许对降解酶的外源化合物诱导进行检测。国际专利申请 WO 99/61622 描述了一个筛选易于代谢降解的潜在新药的系统。所述方法基于人基因 P450CYP3A4 的转录增强子。所述增强子通过包括治疗药物在内的外源化合物诱导子而负责 CYP3A4 基因的转录诱导。

WO 99/48915 公开了一种筛选试验化合物诱导 CYP3A4 基因表达的能力的方法。描述的方法基于一被命名为人孕烷 X 受体 (hPXR) 的孤儿核酸受体的分离, 该受体与位于 CYP3A4 基因调节区的, 如利福平/地塞米松之类的反应元件相结合。所述 hPXR 受体的结合调节 CYP3A4 基因的转录。CYP3A4 酶正好是 55 种多数可通过相似或不同

增强子区域诱导的人 CYP 酶之一。

虽然已经存在检测系统，可以对外源化合物（如新的治疗药物）对降解酶的诱导进行评价，但是仍然需要有替代的方法，允许方便廉价地检测新的治疗药物所诱导任何药物代谢酶的能力。

发明内容

因此，本发明的总体目标是提供一段分离地核酸序列，它至少包含一个 DR-4 核受体结合位点，其中所述核酸序列具有 5-氨基乙酰丙酸合酶基因转录增强子的功能。所述核酸序列的激活是任何细胞色素 P450 基因的诱导标志，而不仅仅是 CYP3A4 的诱导标志。

在优选的实施方案中，所述核酸序列进一步包括核因子 1 结合位点 (NF-1) 和/或 DR-5 核受体结合位点或者包括在 Seq. Id. No. 1 中列出的序列。

本发明包含核因子 1 结合位点的核酸序列，更优选地包含选自组成 Seq. Id. No. 2 到 7 的序列。

在进一步优选的实施方案中，所述核酸序列介导化合物诱导的转录激活。所述化合物优选是用作治疗用途或治疗药物的候选化合物。

本发明的另一个目标是包含本发明核酸序列的遗传构建体，它可操作地与编码报道分子的核酸相连接。所述报道分子优选具有酶活力，更优选的是所述报道分子的活力能够被比色法、放射、荧光或化学发光法 (chemiluminescence) 所测定。

所述报道分子优选自萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、碱性磷酸酶和绿色荧光蛋白质。

本发明的第三个目标是检测调控血红素和/或 P450 细胞色素合成的化合物的方法。所述方法包括以下步骤：将包含本发明遗传构建体的适合的细胞与检测化合物相接触，并检测编码报道基因的核酸序列的表达和/或转录的增加/减少。可检测的报道基因表达和/或转录的增加或抑制指示出化合物增加或抑制血红素和/或 P450 的合成。

在优选的实施方案中，所述检测化合物是用于治疗用途或治疗药物的候选药物。

在本方法进一步优选的实施方案中,所述编码报道基因的核酸序列的增加的表达被比色、荧光、放射性或化学发光法测定。

在特定优选的实施方案中,所述编码报道基因的核酸序列的增加的转录被定量 PCR 测定。

用于本发明方法的优选细胞是 Leghorn Male Hepatoma (LMH) 细胞,其它肝癌细胞、猴肾细胞(CV-1, COS-1)或人肾细胞。

本发明进一步的方面涉及本发明的核酸或其片段的使用,以检测作为血红素和/或 P450 合成调节子的化合物。

此外,本发明还涉及本发明的遗传构建体的使用,以检测作为血红素和/或 P450 细胞色素合成调节子的化合物。

附图简述

当考虑到以下详细的描述时,本发明将被更好的理解,并且上述列出之外的其它目标将变得显而易见。这一描述参考附图,其中:

图 1 A 表示通过限制性内切酶消化和亚克隆进行的位于鸡 ALAS1 转录起始位点上游前 15Kb 的 176bp 和 167bp 药物应答增强子序列的分离。片段被克隆到含有 SV40 启动子的 pLucMCS 萤光素酶报道载体中;

图 1 B 表示 176bp 和 167bp 增强子 DNA 序列。编号表示相对于鸡 ALAS1 基因转录起始位点的序列位置。实线表明 DR4 和 DR5 NR 结合位点。阴影区包含单个的半位点。阴影线标明 NF1 结合位点;

图 1 C 表明片段的报道基因分析。构建体与表达 β -半乳糖苷酶的转染对照构建体一起被转染进 LMH 细胞。细胞随后被 600 μ M PB 处理 16 小时,细胞提取物进行萤光素酶分析。相对萤光素酶水平通过参照转染不包含插入片段的载体的细胞而被标准化,并且表述成诱导倍数。实验被重复至少 3 次,在此显示来自 3 次实验中有代表性实验的数据。误差线代表标准差;

图 2 表示 ADRES 和 mRNA 被不同药物活化的比较。相对萤光素酶水平通过参照转染不包含插入片段的载体的细胞而被标准化,并且表述成诱导倍数。实验被重复至少 3 次,在此显示来自 3 次实验中有代表性实验的数据。误差线代表标准差;

图 3 A 显示位于 176 bp ADRES 元件的 DR4 和 DR5 位点的定点诱

变。176 bp 序列的 DR4 和 DR5 半位点的突变经由基于 PCR 的定点诱变引入。突变被标记在左栏，在图中用交叉号描述。相对萤光素酶水平通过对照转染不包含插入片段的载体的细胞而被标准化（对照设为 1.0），并且以 176 ADRES 的百分数被表述。实验被重复至少 3 次，在此显示来自 3 次实验中有代表性实验的数据。误差线代表标准差；

图 3 B 显示位于 167 bp ADRES 元件的 DR4 位点的定点诱变。167bp 序列的 DR 半位点的突变经由基于 PCR 的定点诱变引入。突变被标记在左栏，在图中用交叉号描述。实验方法与图 3 A 所描述的相同；

图 4 A 表示说明 CXR 结合 176bp ADRES 元件的凝胶迁移率变动分析。如所表示的，放射标记的 ADRES 野生型（泳道 1-5）和突变型（泳道 6-7）序列在体外与转录/翻译的 CXR（泳道 3-7）、鸡 RXR（泳道 2 和 4-7）和抗 RXR 抗体（泳道 5 和 7）孵育。箭头表示未结合的探针，迁移的 CXR- RXR-探针复合体和超迁移的 (supershifted) CXR- RXR-探针-抗 RXR 抗体复合体；

图 4 B 表示说明 CXR 与 167bp ADRES 元件结合的凝胶迁移率变动分析。如所表示的，放射标记的 ADRES 野生型（泳道 1-5）和突变型（泳道 6-7）序列在体外与转录/翻译的 CXR（泳道 3-7）、鸡 RXR（泳道 2 和 4-7）和抗 RXR 抗体（泳道 5 和 7）孵育。箭头表示未结合的探针，迁移的 CXR- RXR-探针复合体和超迁移的 CXR- RXR-探针-抗 RXR 抗体复合体；

图 5 A 表示 CXR 对 176 bp ADRES 元件的反式激活。Cos-1 细胞被含有 4 个重复的野生型、DR4-1、DR5 和 DR4-1/DR5 突变体的构建体所转染，该构建体被克隆到含有胸苷激酶最小启动子的 pBLCAT5 载体上。克隆到 pSG5 表达载体上的鸡 CXR 编码区与表达 pSV β -半乳糖苷酶的作为对照的载体共转染。细胞随后被药物或载体对照处理 16 小时，对提取物进行 CAT 表达分析，如材料和方法所描述，该 CAT 表达通过参照 β -半乳糖苷酶水平而被标准化。实验被重复至少 3 次，在此显示来自 3 次实验中有代表性实验的数据。所有的构建体通过测序被验证，误差线代表标准差；

图 5 B 表示 CXR 对 167bp ADRES 元件的反式激活。Cos-1 细胞被含有单个拷贝的野生型、DR4-1、DR5 和 DR4-1/DR5 突变体的构建体

所转染，该构建体被克隆到含有胸苷激酶最小启动子的 pBLCAT5 载体上。实验方法与图 5 A 所描述的相同；

图 6 表示 LMH 细胞的萤光素酶报道基因分析中扩展的小鼠核心片段的诱导。诱导子甲双吡丙酮为 500 μ M；

图 7 表示经不同药物对小鼠 369 bp DRES 的诱导；

图 8 表示对小鼠 369bp DRES 序列和发现的推定核受体结合位点；

图 9 表示引入小鼠 369bp DRES 序列的 DR4-1 和 DR4-2 位点的突变。半位点被分别和一起突变。突变的碱基对加下划线并表示成斜体；

图 10 表示 LMH 细胞的萤光素酶报道基因分析中小鼠 369bp DRES 的 DR4 突变构建体的诱导；

图 11 表示人 ALAS1 基因不同片段的药物诱导。片段被克隆到 pGL3 萤光酶报道载体 (Promega Corp) 并检测原形 hALAS1 诱导子苯巴比妥 (PB) 和丙基异丙基乙酰胺 (propylisopropylacetamid) (PIA) 的诱导性。LMH 细胞被构建体转染 4 小时之后，细胞被暴露于药物 24 小时，之后分析萤光素酶活力。结果通过分析共转染的 β -半乳糖苷酶活力而对转染效率进行标准化。显示的数据是一代表性的实验；

图 12 表示依赖于 DR-4 元件存在的药物对于 hA75 元件的作用。在 hA75 片段的序列中通过计算机分析发现了推定的 DR-4 型核受体反应元件。在 LMH 细胞的报道基因分析中，此元件的定点诱变取消了这一片段的可诱导性。实验按照图 8 所描述的进行；

图 13 表示在 LMH 细胞中跨越 DR-4 元件的核心序列足以介导药物诱导。hA174 片段来自于 hA795 片段。它长 174bp，其序列中包含 DR-4 反应元件。野生型 hA174 或 DR-4 被破坏的突变体的同向重复被克隆到 pGL3 报道载体并在 LMH 细胞中被检测；

图 14 A 和 B 表示在反式激活分析中 ALA 合成酶药物应答增强子元件可以被小鼠 PXR (14A) 和小鼠 CAR (14B) 诱导；

图 15 A 和 B 表示 369bp ADRES 与 PXR (15A) 和 CAR (15B) 的凝胶迁移分析结果；

图 16 表示来自 hA795 片段的 hA174bp 核心元件在 LMH 细胞中赋予报道基因药物介导的转录激活；

图 17 表示在 LMH 细胞中使用 hA8 药物应答元件的亚片段进行药物诱导分析的结果;

图 18 A 描述位于人 ALAS1 基因中药物应答元件的 hA174bp 核心元件;

图 18 B 描述位于人 ALAS1 基因中药物应答元件的 hA240bp 核心元件;

图 19 A 和 B 描述电泳迁移率变化分析的结果, 分析人 PXR 和人 CAR 结合 hA174bp 和 hA240bp 元件的能力。

实施方式

血红素是生命系统运输氧和代谢所必需的成分。在非红细胞生成细胞中, 此路径最初的酶并且是限速酶——5-氨基乙酰丙酸合酶 (ALAS1) 调节它的生物合成。在正常的生理条件下, 游离的血红素水平低下并且被严紧调控, 因为增加非整合血红素细胞浓度会产生毒性。在施用诸如苯巴比妥 (PB) 或其它原形 CYP 诱导子之类的药物之后, 在肝脏中血红素的浓度相应于依赖血红素的酶水平的提高。这是通过 ALAS1 的诱导来实现的并确保足够且明显协同的血红素的供应以生成功能性细胞色素全蛋白质如细胞色素 P450 (CYP) 的产生明显相一致。

在本发明的范围内发明者鉴定并表征了在编码 ALAS1 的基因的 5'侧翼区, 具有 ALAS1 基因转录增强子功能的核酸元件。所述鉴定的核酸元件负责化合物诱导的 ALAS1 基因转录。

所述核酸元件至少包含一个 DR-4 核受体结合位点。这里使用的术语“DR-4 核受体结合位点”是指同向重复 -4 六聚体重复。此种结合位点以半位点间用 4 个核苷分开的同向重复排列的六聚体半位点为特征。半位点具有如下规范序列 AG (T/G) TCA。这里使用的术语也包括规范序列的功能等价物, 即半位点序列变化体, 它们仍然具有核受体结合位点的功能, 如 CAR (组成性雄烷受体) /RXR (类维生素 A X 受体) 异二聚体。

在优选的实施方案中, 所述 ALAS1 基因增强子进一步包括 NF-1 结合位点。这里使用的术语“NF-1 结合位点”指的是作为转录因子的核因子-1 家族成员结合位点的 DNA 元件, 所述术语包括它的功能

等价物，即序列变化体，它仍然具有转录因子的核因子-1 家族成员结合位点的功能。NF-1 结合位点具有以下共有序列：TGGC (N₄) GCCA (N = 任何核苷酸)。对于本领域的技术人员而言，清楚本发明的序列可能包含上述鉴定的结合位点的不止一个拷贝。

在本发明的范围内表征了赋予化合物诱导的 ALAS1 基因转录的以下序列：Seq. Id. No. 1 (鸡)，Seq. Id. No. 2 (鸡)，Seq. Id. No. 3 到 7 (小鼠)，Seq. Id. No. 8 到 10 和 Seq. Id. No. 39 (人)。示于 Seq. Id. No. 8 到 10 和 39 的核酸序列在此申请提交日期之前已经是数据库的一部分，但是这些序列并没有被表征并且它们的功能/活力还未知。

必须明白这里所使用的术语核酸序列包括本发明序列 1 到 10 的片段、变化体或衍生体。基于公开的 ALAS1 增强子序列和如 Sambrook 等人描述的众所周知的分子生物学方法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001)，本领域的技术人员能够进一步分离赋予化合物诱导 ALAS1 基因转录/表达的序列。

本发明遗传构建体的构建可以使用如 Sambrook 等人描述的标准分子生物学方法进行 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001)。

用于检测方法的细胞可以是任何允许进行化合物诱导分析的合适的细胞。用于本发明方法特别优选的细胞系是 Leghorn male hepatoma (LMH) 细胞系。遗传构建体可以通过众所周知的转染方法被引入细胞如化学转染、电转染或病毒转染。所述宿主细胞能够从基因组位点或从表达载体上表达本发明的遗传构建体。典型的是表达载体包含宿主细胞需要用来完成转录和表达的调控序列并且它可能含有质粒复制所必须的序列，以便以附加体状态存在，或者它可能被设计成与染色体整合。合适的载体如 pGL3LUCpro (Promega) 包含编码萤光素酶的基因。

本发明检测调节血红素和/或 P450 合成的化合物的方法包括以下步骤：将含有本发明遗传构建体的合适的细胞与检测化合物相接触并且检测报道基因表达和/或转录的增强或抑制。检测基因转录/表达增强或抑制的方法依赖于所使用的报道基因，在转录水平可以

使用定量 PCR 或通过检测报道基因产物而实现。优选的检测报道基因产物的方法是比色、荧光或化学发光(chemiluminiscence)分析如萤光素酶分析、CAT 分析或 β -半乳糖苷酶分析。

现在通过实施例的方法进一步描述本发明：

鸡 5-氨基乙酰丙酸基因药物应答增强子的分离和表征

含有一长度约为 35 kb、跨越鸡 ALAS1 基因和 15 kb 5'侧翼区的插入片段的粘粒克隆被分离并被序列分析。三个主要的亚克隆产生于转录起始点的上游区域，包括 3282 bp 的 SmaI 片断和 5056 bp 和 7973 bp 的 EcoRI 片断（图 1 A）。SmaI 克隆从-167 bp 延伸到-3449 bp，而 EcoRI 亚片段分别跨越从-2347 bp 到-7402 bp 和从-7403 bp 到-15376 bp 的区域。这些亚片段被克隆到材料和方法所描述的含有 SV40 启动子的 pLucMCS 修饰的萤光素酶载体中。在用 600 μ M PB 处理瞬时转染的 LMH 细胞中测量药物可诱导性并与对照值进行比较。结果显示 7973 bp 的亚片段对于 PB 具有高度可诱导性，相对于对照值表现了 28 倍的转录活化增加。相比而言 5056 bp 和 3282 bp 亚片段事实上没有表现出应答于药物处理的转录活化（图 1 C）。7973 bp 亚片段（-15376/-7403）被选来作进一步的分析，并被分成位于 pLucMCS 报道载体中的许多亚克隆，导致 176 bp Sau3AI-SmaI 和 167 bp PvuII-HaeIII 元件的分离（图 1 A 和 B）。在 LMH 细胞中，当暴露于 PB 时这些序列在报道基因分析中常规地表现出超过对照值 25-60 倍的诱导（图 1 C）。7973 bp 片段的所有其它部分也被亚克隆，但是当在 LMH 细胞中被检测时，没有表现出药物应答。因为不管与启动子的方向和距离如何，176 bp (Seq. Id. No. 2) 和 167 bp (Seq. Id. No. 1) 片段保持着高度的药物应答性，因此它们被认为是氨基乙酰丙酸合酶药物应答增强子序列 (ADRES) 元件。

最近的发现暗示 NR 涉及药物介导的酶诱导 (2, 3, 8)。由于这一原因，我们扫描了作为潜在核受体反应位点的反应元件，所使用的计算机算法基于根据公布的功能性六聚体半位点编辑的加权核苷酸分布矩阵。在每一个 ADRES 元件中鉴定了两个潜在的孤儿 NRs 结合位点，在 176 bp 序列中两个同向重复在半位点之间具有 4 核苷酸 (DR4) 和 5 核苷酸 (DR5) 的间隔，在 167 bp 序列中两个同向重复在半位点

之间具有 4 核苷酸 (DR4) 的间隔 (图 1 B)。为了清楚, 三个 DR4 结合位点根据它们在基因中的出现次序而被标记, 距转录起始点上游最远的被称为 DR4-1, 距起始点最近的是 DR4-3。推定的 DR4-1 被分别位于 -14186/-14181 和 -14176/-14171 的一完整的半位点 (AGGTCA) 和一不完整的半位点 (AGTTGA) 所定义, 而 DR5 位点的特征是在 -14251/-14246 的一不完整的上游半位点 (AGCTGA) 和在 -14240/-14235 的一完整的下游半位点 (AGGTCA)。在 167 bp 序列中, DR-2 由位于 -13563/-13558 和 -13553/-13548 的一不完整上游半位点 (GGATGA) 和一完整下游半位点 (AGTTCA) 组成, DR4-3 在 -13526/-13521 和 -13516/-13511 具有两个不完全半位点 (GTGTCA 和 GGGGCA)。有趣的是, 176 bp ADRES 也含有一推定的核因子 1 结合位点, 它与 DR5 相重叠, 跨越 -14255 bp 到 -14242 bp, 而 167 bp ADRES 却没有。

接下来对报道基因分析中 ARDES-介导的 ALAS1 诱导水平与生理系统中转录刺激进行比较。因此, 培养在无血清培养基中并被暴露于各种化学诱导子 16 小时的 LMH 细胞中的 ALAS1 mRNA 被定量, 并与使用同样的化合物在 ADRES 的瞬时转染中观察到的诱导模式相比较 (图 2)。检查的化合物包括 PB (600 μ M) 和 PB 样诱导子 PIA (250 μ M), 格鲁米特 (500 μ M) 和强力小鼠 CYP 2B 诱导子 1, 4-双 [2- (3, 5-二氯吡啶氧)] 苯 (TCPOBOP) (10 μ M)。另外, 普通的 CYP3A 诱导子——地塞米松 (50 μ M)、甲双吡丙酮 (400 μ M) 和 10 μ M 米非司酮 (RU-486) 也被用于比较。由于孕烯醇酮 (PCN) 和利福平 (100 μ M) 在 PXR 激活和 CYP3A 诱导上的物种专一性, 因此对它们的效果也感兴趣。如材料和方法所描述的, 信使 RNA 被逆转录并且使用 Taqman 实时 PCR 定量系统量化 ALAS1 cDNA。在 LMH 细胞中 PB 是 ALAS1 的强烈诱导子, 相对于本底转录水平, RNA 的水平平均增加了 16 倍 (图 2)。这一值被选为代表 100% 的诱导, 将所有的其它值与它相比较。通常的 PIA 和格鲁米特诱导子, 以及 3A 专一的诱导子甲双吡丙酮在 ADRES 元件上表现了最强烈的效果, 对转录的刺激超过用 PB 处理所获得到水平。相比而言, 地塞米松、PCN、RU-486 和利福平在 mRNA 水平或 ADRES 激活上具有较小的效果或没有效果。此外在报道分析中, 小鼠专一性化合物 TCPOBOP 没有引起 mRNA 转录或 ADRES 的刺激反应。当两个

ADRES 元件的诱导曲线相互比较时,可见非常小的差异。与 176 bp 元件(Seq. Id. No. 2)相比,167 bp(Seq. Id. No. 1)对 PB 具有两倍的活化反应。同样,176 bp 对格鲁米特的亲和力轻微高于对甲双吡丙酮的亲和力,而 167 bp 元件对甲双吡丙酮表现出了比对格鲁米特更强的反应。这些实验表明在报道基因分析中 ADRES 元件的相对激活具有彼此高度的相似性,并且与来自化学诱导的 LMH 细胞的 mRNA 转录水平高度相似。

位点专一性诱变被用来检测推定的赋予 ADRES 元件与药物应答的 DR4 和 DR5 识别序列中特定核苷酸赋予药物对 ADRES 元件反应的作用(图 3)。如材料和方法所描述的,生成了破坏推定的 NR 结合位点的 DR4 和 DR5 核心识别位点的突变构建体。简要的,结合 PCR,用引物将 DR5 的 5'和 3'端半位点分别转变为 EcoRI 和 PstI 限制性内切酶位点。相似的,DR4 半位点被转变为 EcoRI 和 NcoI 限制性内切酶位点。来自本实验室 M. Podvinec 发展的用于半位点的核苷分布矩阵的数据被用来确定与突变半位点最小程度上类似功能半位点。通过将 AGGTCA 和 AGTTGA 半位点分别转变为非保守的 ACTCGA 和 ATACCA 碱基,从而废除了 DR4-1 半位点。相似的,DR4-2 半位点的 GGATGA 和 AGTTCA 核苷酸都被转变成了 CCCCAC 碱基。如图 3 所示,用引物产生在两个 ADRES 元件的单个和两个 NR 结合位点突变的构建体。

在荧光酶报道基因分析中检测修饰的增强子对 600 μ M PB 的反应,结果示于图 3。这些结果表明,对于产生完全的药物应答而言,176 bp ADRES 的 DR5 和 DR4 识别位点以及 167 bp ADRES 元件的两个 DR4 识别位点都是必需的。DR5 的突变对 176 bp ADRES 元件活性的减少超过 85%,被 PB 的激活从 44 倍降到 6.4 倍,而 DR4-1 的改变对激活的限制超过 60%,刺激从 44 倍降到 16 倍(图 3A)。如图 3B 所描述的,发现 167 bp ADRES 元件的 DR4-2 和 DR4-3 位点对于经 PB 的完全激活都是必要的。DR4-2 位点的改变导致对 PB 反应的降低超过 90%,从 60 倍降到 5.4 倍。DR4-3 位点的突变导致 PB 反应缩小 75%,从诱导 60 倍降到 15 倍。这些研究说明位于推定的 DR4 和 DR5 NR 结合位点的序列对于 PB 激活 ADRES 元件的必要贡献。

因为 DR5 与推定的 NF1(已知涉及修饰药物诱导的转录因子)结

合位点相重叠, 我们检测了 NF1 而不是 NRs 与 DR5 结合赋予 176 bp ADRES 元件激活的可能性(5)。将推定的 NF1 位点转变为共有的鸟 NF1 结合位点(因此破坏了 DR5 的第一个半位点)的突变构建体被产生了, 并且用萤光素酶分析进行检测。如图 3A 所见, NF1 共有序列并没有增加 176 bp ADRES 元件对药物的反应。相反诱导被降低了 66%, 从 44 倍诱导降到 15 倍, 推测是由于 DR5 NR 结合位点被破坏。为了确认这些发现, 从产生于 LMH 细胞的 cDNA 文库中扩增出鸡 NF1-A 并克隆到 pSG5 表达载体上。通过测序确定编码序列的忠实性, 在 LMH 细胞的诱导实验和 Cos-1 细胞的反式激活实验中构建体都被共转染, 在诱导或反式激活上没有导致变化。

最近的发现暗示许多孤儿 NR 涉及细胞色素 P450 的药物诱导(作为综述见(6, 10, 11))。我们的小组已经成功的克隆并表达了鸡 CXR, 并且用电泳迁移率变动分析(EMSAs)展示了 CXR-RXR 与 CYP 增强子的相互反应(2)。因为 DR4 和 DR5 位点对于通过 ADRES 元件展示的转录激活具有明确的贡献, 所以凝胶迁移率变动分析被用来决定是否 CXR 可能与反应增强子结合(图 4)。在体外, 转录/翻译的鸡 CXR 或鸡 RXR 单独都不与 ³²P-放射标记的 176 bp ADRES(图 4A, 泳道 2 和 3)或 167 bp ADRES(图 4B, 泳道 2 和 3)结合。相反, CXR/RXR 异二聚体与药物应答增强子相结合, 并且通过使用抗 RXR 抗体, 这些复合体能够被超迁移(图 4A 和 4B, 泳道 4 和 5)。如减小的迁移和超迁移组分带强度所表示的(图 4B, 泳道 6 和 7), 当使用双突变 DNA 序列时, 与 167 bp ADRES 元件结合的核受体减少了。此外, 当 176 bp ADRES 元件的两个结合位点被突变时, CXR/RXR 异二聚体的结合事实上被消除了(图 4A, 泳道 6 和 7)。这些发现展示了 CXR/RXR 异二聚体与 ADRES 元件通过 DR4 和 DR5 NR 结合位点的相互作用。

为了证实 CXR 在 ADRES 元件激活中的作用, 用 Cos-1 猴肾细胞进行了反式激活实验。这些细胞表达 RXR, 但是在正常条件下并不表现出诱导反应。如材料和方法所描述的, 野生型和突变的 176 bp 元件的 4 拷贝或突变和野生型 167 bp 元件的单拷贝被克隆到含有一 tk 最小启动子的 pBLCAT5 质粒上。CAT 载体而不是萤光素酶被用于反式激活, 是因为 CAT 提供更稳定的表达并且表现出更高的药物应答。这些构建体与含有 CXR 编码序列的 pSG5 表达载体和 β -半乳糖苷酶表

达构建体共转染，以校正转染效率的差异。在为了 CXR 的表达孵育 24 小时之后，使用图 2 中所鉴定的 3 个最好的诱导子——格鲁米特、甲双吡丙酮和 PIA 来检测野生型和突变序列的诱导。如图 5 所示，176 bp 和 167 bp ADRES 元件都被 CXR 反式激活。在 176 bp 元件中，携带突变型 DR5 NR 结合位点的构建体的诱导被减少了 10-25%。DR4-1 结合位点的突变将所有药物的诱导减小到低于 1.6 倍。此外，在 176 bp 元件中两个 NR 结合位点的改变导致药物应答的完全消失。发现 167 bp 元件在反式激活中对药物的反应好于 176 bp 元件，因此，单拷贝就足够。对于三种药物来说，野生型序列的诱导是强烈的，超过未诱导水平的 4.0 到 8.3 倍(图 5B)。暴露于药物之后 DR4-2 突变体表现出更低的诱导，与野生型的值比较降低了 58-66%。类似的，DR4-3 突变序列具有减小的药物应答能力，表现出 167 bp 活力的 55-66%。167 bp 元件的双突变对药物没有反应，确证了 CXR 经由 DR4 和 DR5 NR 结合位点激活 ADRES 元件的作用。

材料和方法

试剂

地塞米松、甲双吡丙酮(2-甲基-1, 2-双-3 吡啶-propadone)、孕烯醇酮(PCN)和利福平购自 Sigma 化学公司。丙基异丙基乙酰胺(PIA)由 Peter Sinclair 博士(Veterans Affairs Hospital, White River Junction, VT)作为礼物赠送。格鲁米特购自 Aldrich。米非司酮(RU-486)从 Roussel-UCLAF 获得。1, 4-双[2-(3, 5-二氯吡啶氧)]苯(TCPOBOP)由 U. Schmidt (Institute of Toxicology, Bayer, Wuppertal, 德国)慷慨提供。苯巴比妥钠盐(5-乙基-5-苯基-巴比妥酸钠盐)购自 Fluka。组织培养试剂、培养基和血清购自 Life Technologies。所有其它试剂和供给品从标准的来源获得。

质粒

含有 SV40 启动子的 pGL3LUC 萤光素酶报道购自 Promega。通过向 pGL3LUC 载体加入跨越 pBluescript SK 载体(Stratagene)多克隆位点中 SacI 到 XhoI 限制性酶切位点的片段，从而将报道质粒进行了修饰，因此大大增加了新 pLucMCS 报道基因的克隆多用性。pBLCAT5

氯霉素乙酰转移酶报道载体已被先前描述(1)。如先前的报道,鸡 CXR 和 RXR 被克隆到 pSG5 表达载体(Stratagene) (2)。用于转染实验的标准化的 pRSV β -半乳糖苷酶载体由 Anastasia Kralli (Biozentrum, University of Basel, Basel, 瑞士) 惠赠。

粘粒的分离

经由以鸡胚胎肝基因组 DNA 为模板、正向引物为 5'-CGG GCA GCA GGT CGA GGA GA-3' (Seq. Id. No. 31)、反向引物为 5'-CAG GAA CGG GCA TTT TGT AGCA-3' (Seq. Id. No. 32) 的 PCR 产生专一于 ALAS1 基因的探针。根据制造商使用说明,使用随机引物标记试剂盒(Roche Molecular Biochemicals)对探针进行 ^{32}P -放射标记。产生于成年雄性 Leghorn 鸡肝的基因组粘粒文库购自 Clontech Laboratories。ALAS1 探针被用于鉴定含有 ALAS1 基因的单个粘粒克隆,并且分离了 5'侧翼区的至少 15 kb,并通过测序确定。

载体的构建

含有 ALAS1 基因和侧翼区的粘粒被 EcoRI 限制性内切酶消化,接近 35 kb 的新序列亚片段被克隆进 pLucMCS 载体的 EcoRI 位点。长度从 10 kb 到 900 bp 变化的 8 个片段被克隆。此外,一编码 ALAS1 启动子区域和接近的 5'侧翼区的 3282 bp SmaI 片段被克隆进 pLucMCS。使用标准亚克隆方法和限制性内切酶将与药物应答的 8 kb EcoRI 区域进一步细分,以分离 Sau3AI-SmaI 176 bp 元件和 PvuII-HaeIII 167 bp 元件。通过使用 BamHI 和 BglIII 限制性内切酶切出一含有目的序列的 222 bp 片段,并将它们连接进 BamHI 线性化的 pBLCAT5 载体,从而将野生型和突变的 176 bp 和 167 bp 元件单拷贝克隆进 pBLCAT5。通过向 BamHI 线性化的 pBLCAT5 载体连续 4 次插入 222 bp 片段,从而使 176 bp 野生型和突变型元件的多倍重复被亚克隆。

细胞培养

Leghorn Male Hepatoma (LMH) 细胞从 American Type Culture Collection 获得,并用补充有 10% FCS、1% 谷氨酰胺 (2mM) 和 1% 青

霉素/链霉素(50 IU/ml)的 Williams E 培养基培养于 10 cm 平皿中。平皿被覆盖有用于常规培养 LMH 细胞的 0.1% 的明胶, 以便于将细胞适当地固定于塑料平板表面。为了转染, 细胞被接种于 12 孔 Falcon 3043 平皿并被扩增至 70-80% 的表面密度。然后根据制造商的说明, 细胞在无血清 Williams E 培养基中被保持 24 小时, 用 FuGENE 6 转染试剂(Roche Molecular Biochemicals)转染。

报道基因表达的分析

用药物或载体处理细胞 16 小时并收获。为了萤光素酶分析, 每孔使用 200 μ l Passive Lysis Buffer (Promega) 完成溶解, 提取物被离心 1 分钟以沉淀细胞碎片。使用萤光素酶分析试剂盒(Promega)和 Microlite TLX1 发光计(Dynatech)对上清进行萤光素酶分析。根据描述测定相对 β -半乳糖苷酶活力(4)。对于 CAT 分析, 每孔用 600 μ l CAT 溶解缓冲液溶解细胞, 提取物被离心 1 分钟以沉淀细胞碎片。根据制造商的规程, 使用 CAT ELISA 试剂盒(Roche Molecular Biochemicals)完成分析。

定点诱变

通过使用标准重叠技术的 PCR 向 ADRES 元件引入位于推定 NR 结合位点的突变。简要的, 使用携带目的突变的重叠引物和载体引物扩增亚片段。这些亚片段被组合并在使用载体引物扩增全长突变片段的二次 PCR 中被用作模板, 被扩增的片段随后被适当的酶消化, 并被克隆进 pLucMCS。正向载体引物和反向载体引物是位于 pGL3 萤光素酶载体(Promega)上的 RV 引物 3 和 GL 引物 2。所有的突变用新罗马字体显示。使用 5'-GGA GGA ACT CGA CAC GAT ACC AAC ATA GCA AT-3' 正向引物(Seq. Id. No. 15)和 5'-CTA TGT TGG TAT CGT GTC GAG TTC CTC CCT G-3' 反向引物(Seq. Id. No. 16)产生 DR4-1 双突变构建体。使用 5'-GAA TTC GCC AAC TGC AGC CAG GCT GTC C-3' 正向引物(Seq. Id. No. 17)和 5'-CAG CCT GGC TGC AGT TGG CGA ATT CTC CTC-3' 反向引物(Seq. Id. No. 18)扩增 DR5 双突变体。使用 5'-CCC CAC GCA GCC CCA CCG CTC GGC TGA ACT CGT G-3' 正向(Seq. Id. No. 19)和 5'-GTG GGG CTG CGT GGG GCA GCA GAG AAA GTT CAGG-3' 反向(Seq. Id. No. 20)引物产生 DR4-2 双突变体。

使用 5'-GAA TTC ACA GCC ATG GTG AAG ATC AGC-3' 正向引物 (Seq. Id. No. 21) 和 5'-CCA TGG CTG TGA ATT CAG TCA CGA G-3' 反向引物 (Seq. Id. No. 22) 扩增 DR4-3 双突变体。使用 5'-GTT TAA AGC TGG CAC TGT CCC AAA-3' (Seq. Id. No. 23) 和 5'-CTT TGG CAC AGT GCC AGC TTT AAA C-3' (Seq. Id. No. 24) 正向和反向引物产生鸟 NF1 共有序列 (9)。在 PCR 重叠之后, 产物被 BglIII 和 EcoRI 或 NotI 限制性内切酶消化, 并被克隆到 pLucMCS。所有的构建体被测序验证。

定量 PCR

将 LMH 细胞平铺于 12 孔平板, 扩展至 70-80% 的表面密度并在无血清培养基中孵育 24 小时。然后按照制造商说明, 将细胞暴露于药物或载体并用 Trizol 试剂 (Gibco BRL) 分离 RNA。用 Moloney 小鼠白血病病毒逆转录酶试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals) 对 1 μ g 的总 RNA 进行逆转录。使用 Taqman PCR 核心试剂试剂盒 (PE Applied Biosystems) 完成 PCR 并用 ABI Prism 7700 序列检测系统 (PE Applied Biosystems) 定量转录水平。使用测量 $\Delta\Delta C_t$ 的相对定量方法测定相对转录水平。在这些反应中使用了以下引物和探针。ALAS1: 探针, 5'-TTC CGC CAT AAC GAC GTC AAC CATCTT-3' (Seq. Id. No. 25); 正向引物, 5'-GCA GGG TGC CAA AAC ACAT-3' (Seq. Id. No. 26); 反向引物, 5'-TCG ATG GAT CAG ACT TCT TCAACA-3' (Seq. Id. No. 27)。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH): 探针, 5'-TGG CGT GCC CAT TGA TCA CAA TTT-3' (Seq. Id. No. 28); 正向引物, 5'-GGT CAC GCT CCT GGA AGA TAG T-3' (Seq. Id. No. 29); 反向引物, 5'-GGG CAC TGT CAA GGC TGA GA-3' (Seq. Id. No. 30)。在分离的试管中测定转录水平并使用 GAPDH 值来标准化 ALAS1 值。

凝胶迁移率变动分析

按照制造商规程, 使用 TNT T7 Quick Coupled Translation System (Promega) 表达鸡 CXR 和 RXR 蛋白。在放射标记的 [α -³²P]ATP 存在的情况下通过 Klenow 反应标记探针并通过 Biospin 6 层析柱纯化。如先前描述的 (2, 7), 总量相当于 100,000 cpm 的标记的寡聚核

苷酸被用于在 10 mM Tris-盐酸 (8.0)/40 mM KCl/ 0.05% Nonidet P40/6%甘油 (体积/体积)/ 含有 0.2 μ g 聚(dI-dC)的 1 mM DTT 和 2.5 μ l 体外合成的蛋白质中进行的每一反应。为了检测超迁移, 0.5 μ l 单克隆抗小鼠 RXR 兔抗体(由 P. Chambon 惠赠, Universit Louis Pasteur, Illkirch, 法国)被加入反应混合物中。这一抗体与鸡 RXR 相互反应已在之前的 Western 杂交中被检测(数据未显示)。反应混合物在室温孵育 20 分钟, 在 0.5X 的 Tris/硼酸盐/EDTA 缓冲液中, 6% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 接着进行放射自显影。

反式激活

根据先前描述的方法, 在 Cos-1 猴肾细胞(由 A. Kralli 慷慨提供, Biozentrum, University of Basel, Basel, 瑞士)中检测了决定核受体 CXR 对 ALAS-1 诱导贡献的实验(2)。简要的, 细胞在 10cm Falcon 3003 平板上扩增 3 天, 使用补充有 10% 的活性炭解析的 FBS, 并不含酚红的 DMEM/F12 培养基(Gibco BRL)。然后细胞被平铺于 6 孔的平板并扩增过夜至接近 30% 的密度。然后用 PBS 漂洗细胞并不再经进一步的添加, 保持于 Optimem (Gibco BRL) 用于转染。根据制造商规程, 每孔使用 3ml LipofectAMINE (Invitrogen) 完成加有 800ng pSV β -半乳糖苷酶构建体和 50ng CXR 表达载体的 1 μ g 报道基因的转染。在孵育 24 小时之后, 使用 PBS 漂洗细胞, 并加入含有药物或载体对照的包含 10% 脱脂/活性炭解析的 FBS 的 DMEM/F12。孵育 16 小时后, 使用 PBS 漂洗细胞, 并用 600 μ l CAT 裂解缓冲液溶解细胞, 用 CAT-ELIZA 试剂盒(Roche Molecular Biochemicals)分析 CAT 酶。然后对照 β -半乳糖苷酶水平标准化 CAT 水平, 以补偿转染效率的差异。

小鼠 5-氨基乙酰丙酸基因药物应答增强子的分离和表征 mALASI 5'侧翼区的克隆

因为已知的 mALASI 序列信息仅有几百个碱基对, 所以分离 5'侧端翼区的策略是通过 southern 印迹的“染色体步行法”。为了这一目的, 使用了两个命名为 113 和 266 的细菌人工染色体(BAC)克隆(BAC 113d22 和 266n18, 小鼠 C57 B/6 来自 Genome Systems Inc. ,

St. Louis, MO, USA)。通过所述方法的应用，4个跨越17 kb侧翼区的不同克隆被鉴定了。在这些克隆中—2.6 kb的片段在报道基因分析中是“可诱导的”。

2.6 kb HindIII 片段(-14.7kb到-17.3kb)被克隆如下：3μg BAC 266被HindIII消化过夜。以0.7%的凝胶、90V运行6小时电泳，提取2.6 kb条带，并与HindIII切割的、去磷酸化的、凝胶纯化的pBS bluescript (Stratagene, La Jolla, California, USA)连接，并被热休克转化。用EcoRI和KpnI亚克隆进pGL3LUCpro + MCS，以便片段处于正向。在使用LMH (Leghorn male hepatoma)细胞系统的萤光素酶报道分析中所述构建体表现出了药物可诱导性。

2.6 kb HindIII 片段中药物应答增强子序列(DRES)的鉴定

本发明的发明者发现在先前的申请PCT/IB02/01258中指定为2.6 kb HindIII片段的序列事实上在基因组中具有2.8 kb的长度。此片段在细菌中的克隆导致没有功能意义的0.2 kb的消失。

2.6 kb的片段被完全测序。片段具有2604 bp的长度。为了便于定位，以所述片段的5'端为1开始编号。使用2.6 kb片段为模板扩增了以下片段：280bp片段(398到677) (Seq. Id. No. 4)，321bp片段(398到718) (Seq. Id. No. 5)，328bp片段(350到677) (Seq. Id. No. 6)和369bp片段(350到718) (Seq. Id. No. 7)。使用了如下引物：

280bp 片段：mALAS-16.6FwdKpn (Seq. Id. No. 11)和 mALAS-16.35rvXhoI (Seq. Id. No. 12)。

328bp 片段：mALAS-16.65fwdKpn (Seq. Id. No. 13)和 mALAS-16.35rvXhoI (Seq. Id. No. 12)。。

321bp 片段：mALAS-16.6fwdKpn (Seq. Id. No. 11)和 mALAS-16.3rvXhoI (Seq. Id. No. 14)。

369bp 片段：mALAS-16.65fwdKpn (Seq. Id. No. 13)和 mALAS-16.3rvXhoI (Seq. Id. No. 14)。

通过使用SacI/XbaI消化2.6 kb片段分离到—175 bp的片段(441 to 615) (Seq. Id. No. 3)。所有的片段被亚克隆到pGL3LUCpro + MCS载体，并在LMH报道基因分析中检测产生的构建体的可诱导性

(图6)。所有的5个片段都表现出与应用诱导物 500 μ M 甲双吡丙酮相同的诱导。369 bp 的片段被称为药物应答增强子序列 DRES。

369 bp DRES 序列和发现的推定核受体结合位点示于图8。使用 0.8 的核心相似性和 0.85 的矩阵相似性,通过 MatInspector 发现了推定核受体结合位点。推定核受体结合位点包括:上游刺激因子 (USF), 激活蛋白 1/4 (AP1/AP4), 核因子 1 (NF-1), CAR/CXR/PXR (DR4), ets-1, 雌激素受体 (ER), RAR-相关的孤儿受体 α 1 (RORA1), PPAR (DR1), 核因子 κ B (NF κ B), c-Rel, 固醇反应元件结合蛋白质 (SREBP), 刺激蛋白质 1 (SP1)。SacI 和 XbaI 是 175 bp 核心片段的限制位点。粗箭头表示来自扩展的核心 SacI/XbaI 片段克隆的 5' 和 3' 端。

在 LMH 萤光素酶报道基因分析中的 369 bp DRES 的药物诱导模式

为了比较 369bp DRES 与其它可诱导的片段,一系列不同的药物被用作诱导子: clothrimazole (Clo, 10 μ M)、地塞米松 (Dex, 50 μ M)、格鲁米特 (GE, 500 μ M)、甲双吡丙酮 (Met, 500 μ M)、苯巴比妥 (PB, 500 μ M)、PCN (10 μ M)、丙基异丙基乙酰胺 (PIA, 250 μ M)、利福平 (Rif, 10 μ M)、RU486 (10 μ M)、TCPOBOP (10 μ M)。

图7表示 369bp DRES 被不同药物的诱导。显示的数据来自两独立的实验。如已经从 2.8 kb HindIII 克隆上观察到的,甲双吡丙酮、格鲁米特和 PIA 是最强的诱导子。

DR4 的诱变

迄今的所有实验显示含有 DR4 位点的区域对于获得任何诱导是绝对需要的。为了显示 DR4 位点 (DR4-1 和 DR4-2) 的直接参与,用如下方式将它们突变 (在 369 bp 背景中):

DR4 半位点被单个和二者一起突变 (见图9)。突变的碱基对加下划线和表示成斜体。

为了具有便于分析成功的诱变的工具, NR1 半位点被突变成 EcoRI 位点, NR2 半位点被突变成 PstI 位点。

诱变/克隆

在第一个诱变中，每一个六聚体半位点被单个突变。使用 rvp3 质粒和

DR4mt1rv (Seq. Id. No. 33) 及 glp2 质粒和 DR4mt1fwd (Seq. Id. No. 34) [DR4-2/hs1]、DR4mt2rv (Seq. Id. No. 35) 和 DR4mt2fwd (Seq. Id. No. 36) [DR4-2/hs2] 引物对，以 369bp-LUC 克隆作为模板完成第一次 PCR。将 PCR 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并提取条带。以第一次 PCR 的产物为模板（每一产物取 20 μ l 中的 1 μ l）完成第二次 PCR，并用外部引物 rvp3 和 glp2 进行 PCR。将 PCR 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳并提取条带。然后用 KpnI/XhoI 消化片段，在纯化之后直接与 KpnI/XhoI 切割的 pGL3LUCpro + MCS 连接（无需条带的凝胶分离，因为在消化后只有一条片段具有用于克隆的兼容粘性末端）并被热休克转化。小量制备的 DNA 被 KpnI/XhoI 消化（插入）和 XhoI/EcoRI (DR4-2/hs1, 检查突变) 或 XhoI/PstI (DR4-2/hs2, 检查突变) 消化所分析。最终，克隆被测序以确证目的突变以及没有其它 bp 突变。

在另一步骤中，两个半位点被突变了。获得 DR4-2/hs1, 2 双突变体的方法与以上相似，只是 369DR4mt2-LUC 被用作第一次 PCR 的模板，并使用引物 DR4mt2mt1fwd (Seq. Id. No. 37) 和 DR4mt2mt1rv (Seq. Id. No. 38)。这一构建体被简短的命名为 369DR4mut-LUC。

LMH 报道基因分析中的可诱导性

图 10 表示 LHM 细胞的萤光素酶报道基因分析中小鼠 369 DRES DR4 突变构建体的诱导。应用 500 μ M 甲双吡丙酮诱导子。数据来自三个独立的实验。

在反式激活分析中利用小鼠 CAR 和小鼠 PXR 对 ALA 合酶药物应答增强子序列的可诱导性。

图 14 反式激活

为了检测突变在转录激活上的效果，在 CV-1 细胞中完成了使用小鼠 CAR 和小鼠 PXR 以及它们各自的诱导子 PCN 和 TCPOBOP 的反式激活（图 14）。可诱导的 DNA 构建体被亚克隆到 CAT5 报道载体，并在 CV-1 细胞中检测它们被核受体转录因子反式激活的能力。作为对照，克隆到 pSG5 表达载体的小鼠 PXR (A) 和小鼠 CAR (B) 编码区与

表达 pSV β -半乳糖苷酶的载体共转染。随后细胞被药物 (A, PCN; B, TCPOBOP) 或载体对照处理 16 小时, 细胞提取物被进行对照 β -半乳糖苷酶水平而标准化的 CAT 表达分析。实验被重复至少 3 次, 误差线代表标准差。

如图 14 A 所见, DR4-1 结合位点的单突变使 PCN 的诱导分别降低到 2.7 倍和 2.0 倍, 而双突变表现出了 1.9 倍的激活。相对于野生型 5.6 倍值, DR4-2 的单突变并没有显著降低诱导, 分别表现出 5.8 和 5.3 倍的激活, 而双突变被减小到 2.5 倍的诱导。位于 369 bp 元件的两 NR 结合位点的改变导致 PXR 介导的药物应答的消除。在图 14B 中, DR4-1 单一和双突变体的 CAR 反式激活对 TCPOBOP 都没有表现出任何反应, 甚至连基本的 CAR 活力都被消除了。相比而言, DR4-2/hs1 和 DR4-2/hs2 单突变体仍然分别表现出超过雌烷醇处理水平 2.5 和 1.9 倍的基本表达。在 DR4-2/hs1 构建体中, TCPOBOP 的诱导以 1.4 倍略超过基本表达, 然而对于 DR4-2/hs2 构建体或双突变体没有观察到诱导。对于 DR4-1, 2/hs1, 2 四重突变体, 在不存在雌烷醇的情况下没有观测到 CAT 表达的基本增加, 并且诱导能力被完全消除了。

369 bp ADRES 元件中的 DR4-1 和 DR4-2 位点被发现对于经 PCN 或 TCPOBOP 的完全激活都是需要的。总的来说, 数据表明 DR4-1 对于经由 CAR 或 PXR 的 NR 介导的诱导是必需的, 而 DR4-2 可能以更为间接的方式对 369 bp ADRES 的全面激活作出贡献。这些研究展示了位于推定的 DR4 NR 结合位点的序列对 ADRES 元件的药物诱导的必要贡献。

决定小鼠 RXR 和小鼠 CAR 与增强子在何处结合的凝胶迁移分析

因为 DR4-1 和 DR4-2 NR 结合位点对于在反式激活中 ADRES 元件表现出的转录激活有明显的贡献, 凝胶迁移率变化分析被用来决定 PXR 和 CAR 可能结合增强子的地方 (图 15)。按照制造商规程, 使用 TNT T7 Quick Coupled Translation System (Promega) 表达小鼠 CAR、PXR 和 RXR 蛋白质。为了标记 DNA 片段, 在放射标记的 [α -³²P] ATP 存在的情况下, 末端被 E. coli DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段补平, 并经 Biospin 6 层析柱纯化。如先前描述的 (10, 12), 总量相当于

100,000 cpm 的标记的寡聚核苷酸被用于在 10 mM Tris-盐酸 (8.0)/40 mM KCl/ 0.05% Nonidet P40/6%甘油 (体积/体积)/ 含有 0.2 μ g 聚 (dI-dC) 的 1 mM DTT 和 2.5 μ l 体外合成的蛋白质中进行的每一反应。反应混合物在室温孵育 20 分钟, 在 0.5X 的 Tris/硼酸盐/EDTA 缓冲液中, 6% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 接着进行放射自显影。

在小鼠 RXR 和小鼠 PXR (Fig. 15A) 或小鼠 CAR (Fig. 15B) 存在的情况下检测 369 bp 野生型和突变构建体。体外转录/翻译的小鼠 RXR 或小鼠 PXR 单独与 32 P-放射标记的 369bp ADRES 结合 (图 15 A, 泳道 1 和 2), 而 PXR/RXR 异二聚体与野生型药物应答增强子结合 (图 15A, 泳道 3)。如泳道 4、5 和 6 条带的缺失所分别说明的, 在 DR4-1/hs1 和 DR4-1/hs2 单突变以及 DR4-1/hs1, 2 双突变 DNA 序列中 PXR/RXR 与 369bp ADRES 元件的结合被消除了。如泳道 7 所示, 有趣的是, DR4-2/hs1, 2 构建体仍然与 PXR/RXR 异二聚体结合。此外, PXR/RXR 异二聚体与 DR4-1, 2/hs1, 2 四重突变体的结合也缺失了 (泳道 8)。情况相似, 小鼠 CAR 和 RXR 作为同型二聚体不能与 369bp ADRES 结合, 而在 RXR/CAR 异二聚体的存在下可观测到改变 (图 15B, 泳道 1-3)。在 DR4-1/hs1 和 DR4-1/hs2 单突变以及 DR4-1/hs1, 2 双突变中 CAR/RXR 的结合也被消除了 (分别为泳道 4-6), 但是在 DR4-2/hs1, 2 双突变中仍然存在 (泳道 7)。不出意外的是, 如泳道 8 所观测到的, DR4-1, 2/hs1, 2 四重突变体不与 CAR/RXR 异二聚体结合。总之, 这些发现说明 PXR/RXR 和 CAR/RXR 异二聚体与 369bp ADRES 元件中的 DR4-1 而不是 DR4-2 结合位点反应。

人 ALA 合成酶 (ALAS1) 看家基因的药物调节

通过使用计算机协助的筛选方法和公布的可利用的序列信息, ALAS1 5'侧翼区的一些区域被定义为潜在的经由核受体的人 ALAS 看家基因的药物诱导介导子。定义的区域从含有此基因 30 kb 上游区域的 BAC 克隆中被分离到, 并被引入含有萤火虫荧光素酶基因的报道载体, 该荧光素酶基因作为基因激活的报道基因。这些构建体在已知的唯一保持药物介导诱导的连续分裂细胞系——LMH 鸡肝细胞瘤细胞中被检测。

在这些最初的筛选方法中,定义了与原形诱导子药物应答的两个区域。

这些区域更好的表征部分被称为 hA795 (Seq. Id. No. 9), 并位于转录起始点上游约 20 kb。通过分割这一片段, 我们能定义一大小为 174 bp (Seq. Id. No. 8) 的短元件, 它在 LMH 细胞中足以赋予诱导。此元件被命名为 hA174。在定点诱变实验中发现 hA174p 片段中的一 DR-4 型核受体识别位点对于药物诱导是必需的。

第二个药物诱导片段被称为 hA8 (Seq. Id. No. 10), 长度为 917 bp, 位于转录起始点上游约 16 kb。它至少包含预知的 DR-3 和 DR-4 型核受体反应元件。

在异源细胞系 (猴肾 CV-1 细胞) 和人肝细胞瘤 HepG2 细胞中的反式激活分析中, 我们评估了哪个核受体赋予 (CAR) 观察到的激活。两个候选受体——孕烷 X 受体 (PXR) 和组成性雄烷受体被在这些片段上进行检测。使用两个片段和 hA174 亚片段观察了由人 PXR 的诱导及由小鼠和人 CAR 的激活。mCAR 诱导的活性可以被反向兴奋剂 3 α -雌烷醇抑制约 50%, 此抑制可以被正向兴奋剂 TCPOBOP (1, 4-双 [2-(3, 5-二氯吡啶氧)] 苯) 逆转。

结果

人 ALAS1 基因不同片段的药物诱导

片段被克隆进萤光素酶报道载体 (Promega Corp) pGL3, 并通过原型 hALAS1 诱导子苯巴比妥 (PB) 和丙基异丙基乙酰胺 (PIA) 检测其诱导性。用构建体转染细胞 4 小时之后将细胞暴露于药物 24 小时, 之后分析萤光素酶活力。通过分析共转染的 β -半乳糖苷酶活力而将结果进行转染效率的标准化。显示的数据是一代表性的实验 (图 11)。

药物对 hA795 元件的作用依赖于 DR4 基元的存在

在 hA795 片段 (Seq. Id. No. 9) 的序列中, 通过计算机分析发现了一推定的 DR-4 型核受体反应元件。在 LMH 细胞中的报道基因分析中, 此元件的定点诱变消除了此片段的可诱导性 (图 12)。

跨越 DR-4 元件的核心序列足以介导 LMH 细胞中的药物诱导

hA174 片段 (Seq. Id. No. 8) 来自于 hA795 片段。它长度为 174 bp, 并在序列中包含 DR-4 反应元件。野生型 hA174 的同向重复或 DR-4 被破坏的突变体被克隆到 pGL3 报道载体, 并在 LMH 细胞中进行检测 (图 13)。数据来自一代表性的实验。

图 16 表示在 LMH 细胞中赋予报道基因药物介导的转录激活的来自 hA795 片段的 hA174 核心元件。我们更详细地研究了各种反应元件半位点对此元件介导的药物诱导的贡献。在 hA174 元件中发现了一 3 核受体反应元件半位点的排列, 它导致了 DR-4 型和 DR-5 型反应元件被预测 (参见图 18A)。通过定点诱变, 我们检测了这些半位点中每一个在药物诱导中的参与。在 2xhA174 报道构建体的背景中, hA174 元件的两个拷贝的每一单独半位点被突变了。如上所描述的, 野生型和突变的构建体随后在 LMH 细胞中被用于报道基因激活的检测。用 400 μ M 苯巴比妥 (PB) 或 250 μ M 丙基异丙基乙酰胺 (PIA) 诱导细胞。作为对照, 载体 (0.1% DMSO) 被单独加给细胞。24 小时后, 分析萤光素酶活力, 并对照共转染的 β -半乳糖苷酶活力进行标准化, 以补偿转染效率。HS1 或 HS2 半位点的诱变导致此片段可诱导性的消除, 而 HS3 半位点的改变仅降低了诱导水平。从这一点我们得出结论: 由 HS1 和 HS2 半位点组成的 DR-4 元件对于药物诱导是必需的。通过 HS3 半位点的诱变所观察到的诱导的改变可能表明此半位点在药物诱导中单独的调控作用或作为与 HS2 联合的 DR-5 的作用。显示的数据是 3 个独立实验的平均值加 1SD。

图 17 表示 hA8 药物应答元件 (Seq. Id. No. 10) 的亚片段。

为了定义保持可诱导性的核心序列, 用 SacI 和 NsiI 消化末端携带 PCR 引入的 KpnI 和 XhoI 限制性位点的 hA8 片段 (Seq. Id. No. 10)。产生的四个片段: 100bp KpnI/SacI 片段、374bp SacI/NsiI 片段、240bp NsiI/NsiI 片段和 231bp NsiI/XhoI 片段被克隆到报道基因载体并随后在 LMH 细胞中用于药物诱导检测。在这些片段中只有 240 bp 的片段 (命名为 hA240) (Seq. Id. No. 39) 能够赋予反应于药物的转录激活。随后, 在 hA240 核心片段中突变了一预测的 DR-4 元件 (参照图 18B) 的两个半位点, 并观察这一突变在药物诱导上的效果 (240mutDR4)。在 LMH 细胞报道基因分析中, DR4 元件半

位点的改变消除了药物诱导。显示的数据是 3 个独立实验的平均值加 1SD。

图 18 详细的描述了位于人 ALAS1 基因的两个药物应答区的核心元件。位置数字指出这些序列在人基因组中相对于人 ALAS1 转录物的转录起始点的位置。反应元件被框成灰色，单个的半位点被其上的箭头标记，如果有必要区分，则在序列下面标记。A 中描述了 hA174bp 核心 (Seq. Id. No. 8)。灰框表示由 3 个独立的半位点组成的 DR-4/DR-5 位点簇。B 中展示了 240 bp 核心 (Seq. Id. No. 39)，灰框和箭头标记功能性 DR-4 元件。

图 19 描述了一电泳迁移率变化分析的结果，分析人 PXR 和人 CAR 结合 hA174 和 hA240 元件的能力。这些核受体的结合发生在与人 9-式视黄酸受体 RXR α 形成的异二聚体状态。使用 TNT 网织红细胞裂解物偶联的转录 / 翻译系统 (Promega Corp.)，从编码 RXR α 、RXR 或 CAR 的表达质粒中体外获得了受体蛋白。

图 19A 表示使用放射性标记的 hA174 野生型片段或半位点 2 被突变的 hA174 片段 (参见图 18A) 的分析。泳道 1-4: 野生型 hA174 单独与无受体 (假转录/翻译) 或与 RXR α 、PXR 或 CAR 孵育。使用单一受体没有观察到复合体。泳道 5 和 7: 野生型 hA174 与 RXR α 和 PXR 或 RXR α 和 CAR 孵育，在上面观察到了放射性标记的探针和蛋白质之间的复合体形成。泳道 6 和 8: 条件同泳道 5 和 7，但是应用半位点 2 突变的放射性标记的探针，而不是野生型 hA174，不再形成复合体。

图 19B: 取代 hA174 片段，野生型或 DR4 突变体 hA240 片段被放射性标记，并用作探针。泳道 1-4: 野生型 hA240 单独与无受体 (假转录/翻译) 或 RXR α 、PXR 或 CAR 孵育。使用单一受体没有观察到复合体。泳道 5 和 7: 野生型 hA240 与 RXR α 和 PXR 或 RXR α 和 CAR 孵育，在上面观察到了放射性标记的探针和蛋白质之间的复合体形成。泳道 6 和 8: 条件同泳道 5 和 7，但使用放射性标记的 hA240DR4 (2) 突变体取代野生型探针。不再形成复合体。

使用的缩写是: ALAS, 5-氨基乙酰丙酸合酶; ADRES, 氨基乙酰丙酸药物应答增强子序列; PB, 苯巴比妥; DR, 六聚体半位点同向重复; h, 小时; bp, 碱基对; LMH, 雄性来亨 (leghorn) 鸡肝细胞瘤; kb, 千碱基; NF1, 核因子 1; CYP, 细胞色素 P450; CXR, 鸡外源化

合物受体；PXR，孕烷 X 受体；CAR，组成性雄烷受体；RXR，9-顺式视黄酸受体；PIA，丙基异丙基乙酰胺；PCN，孕烯醇酮；TCPOBOP，1, 4-双[2-(3, 5-二氯吡啶氧)]苯；LUC，萤光素酶；米非司酮，RU-486；三甲苯咪唑，1-[o-三苯甲基氯]-咪唑；EMSA，电泳迁移率变化分析；cpm，每分钟计数；FCS，胎牛血清。

虽然在此展示和描述了本发明优选的实施方案,但是需要明确理解的是本发明并不被限于此,而可能是以下权利要求范围内的各种具体化和实践。

参考文献

1. Boshart, M. , M. Kluppel, A. Schmidt, G. Schutz, and B. Luckow. 1992. Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* 110: 129- 30.
2. Handschin, C., M. Podvinec, and U. A. Meyer. 2000. CXR, a chicken xenobiotic-sensing orphan nuclear receptor, is related to both mammalian pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10769-74.
3. Honkakoski, P., I. Zelko, T. Sueyoshi, and M. Negishi. 1998. The nuclear orphan receptor CAR- retinoidX receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 18: 5652-8.
4. Iniguez-Lluhi, J. A. , D. Y. Lou, and K. R. Yamamoto. 1997. Three amino acid substitutions selectively disrupt the activation but not the repression function of the glucocorticoid receptor N terminus. *J Biol Chem* 272: 4149-56.
5. Kim, J. , G. Min, and B. Kemper. 2001. Chromatin assembly enhances binding to the CYP2B1 Phenobarbital-responsive unit (PBRU) of nuclear factor 1, which binds simultaneously with constitutive androstane receptor (CAR)/retinoidX receptor (RXR) and enhances CAR/RXR-mediated activation of the PBRU. *J Biol Chem* 276: 7559-7567.
6. Kliewer, S. A. , J. M. Lehmann, and T. M. Willson. 1999. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse.

Science 284: 757-60.

7. Kliewer, S. A. , J. T. Moore, L. Wade, J. L. Staudinger, M. A. Watson, S. A. Jones, D. D. McKee, B. B. Oliver, T. M. Willson, R. H. Zetterstrom, T. Perlmann, and J. M. Lehmann. 1998. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. Cell 92: 73-82.

8. Lehmann, J. M. , D. D. McKee, M. A. Watson, T. M. Willson, J. T. Moore, and S. A. Kliewer. 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. J Clin Invest 102: 1016-23.

9. Rupp, R. A. , U. Kruse, G. Multhaup, U. Gobel, K. Beyreuther, and A. E. Sippel. 1990. Chicken NFI/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NFI-A, NFI-B and NFI-C with homologues in mammalian genomes. Nucleic Acids Res 18: 2607-16. 10. Savas, U. , K. J. Griffin, and E. F. Johnson. 1999. Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors. Mol Pharmacol 56: 851-7. 11. Waxman, D. J. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. Arch Biochem Biophys 369: 11-23.

序列表

<110> University Basel

<120> 5-氨基乙酰丙酸合酶基因的增强子序列

<130> 06052PC1

<150> PCT/IB02/01258

<151> 2002-04-09

<160> 39

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 167

<212> DNA

<213> 原鸡

<400> 1

ctgcctccag tcttgaactt tctctgtgtg gatgagcaga gttcacgctc ggctgaactc	60
gtgactgtgt caacaggggg catgaagatc agcaccaggc aaagggtgagc ggaagtgcaca	120
agaatgagggc agagaccttt gggacaaaaga gttcccccacc cgtggggg	167

<210> 2

<211> 176

<212> DNA

<213> 原鸡

<400> 2

gggctccatc ggctcttcca gggtattgtt atgttcaact cgtgtgacct tcttcctgtt	60
tttcaagggt ctgataacaa acttctagga cagcctgggt acccttgggt cagcttcctc	120
tttaaactcc ggtggctttt gcttcattgc ctagtgttta cccagcagta aagatc	176

<210> 3

<211> 175

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 3

tgagctcatc aggttcctgg tggagagctg ggtgaaccga gttcgtttgc actgccttgg	60
cctgtgtgtg gcttcaggaa caggtcatgc tccaggattt aggacacagg ttagctgata	120
aggcccatgg agccgggtgat atgaccgcga gggcactcc ctcgcccac gtcta	175

<210> 4

<211> 280

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 4

agtccagtca gaacctttctg gcttctgcca tgagacagcc tatgagctca tcaggttcct	60
ggtagagagc tgggtgaacc gagttcgttt gcactgcctt ggctgtgtg tygcttcagg	120

```

aacaggatcat gctccaggat ttaggacaca ggtagctga taaggcccat ggagccggtg 180
atatgaccgg cagggtcact cctctgccc aagtctagat acttggttcc ctctttagac 240
tccagatcaa ggactccaga tctgtcatgg actcagaaaa 280

```

<210> 5
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```

<400> 5
agtcacgtca gaaccttctg gttctgcca tgagacagcc tatgagctca tcaggttcct 60
ggtagagagc tgggtgaacc gagttcgttt gcactgcctt ggccgtgtgtg tggcttcagg 120
aacaggatcat gctccaggat ttaggacaca ggtagctga taaggcccat ggagccggtg 180
atatgaccgg cagggtcact cctctgccc aagtctagat acttggttcc ctctttagac 240
tccagatcaa ggactccaga tctgtcatgg actcagaaaa cccccagta cccccacc 300
cccgctgctc cctctatga t 321

```

<210> 6
 <211> 328
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```

<400> 6
gtggctgggt tgggatggga tgggaaggct tgtgtctctc tgattcctag tcagtcaga 60
accttctggc ttctgccatg agacagccta tgagctcacc aggttcctgg tggagagctg 120
ggtagaacga gttcgtttgc actgccttgg cctgtgtgtg gcttcaggaa caggctatgc 180
tccaggattt aggaacacag ttagctgata aggcccatgg agccggtgat atgaccgca 240
gggtcactcc ctctgcccaa gtctagatac ttgtttccct ctttagactc cagatcaagg 300
actccagatc tgtcatggac tcagaaaa 328

```

<210> 7
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```

<400> 7
gtggctgggt tgggatggga tgggaaggct tgtgtctctc tgattcctag tcagtcaga 60
accttctggc ttctgccatg agacagccta tgagctcacc aggttcctgg tggagagctg 120
ggtagaacga gttcgtttgc actgccttgg cctgtgtgtg gcttcaggaa caggctatgc 180
tccaggattt aggaacacag ttagctgata aggcccatgg agccggtgat atgaccgca 240
gggtcactcc ctctgcccaa gtctagatac ttgtttccct ctttagactc cagatcaagg 300
actccagatc tgtcatggac tcagaaaa cccagtaacc accccacccc cgtctgtccc 360
tctatgat 369

```

<210> 8
 <211> 174
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 8
 gcgcacaaagtc aacacaaagcc tctccaccgt gtgtccatgt ttatgtgtat gcgctgtgcc 60
 ccgtcatgcc acctggagcc agggactcca gtgacctctc cttgcacaag cctctgtctgg 120
 tttgggaag attggcatga catcagccaa gctctggcct tgcctttttt cctt 174

<210> 9
 <211> 800
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 9
 caggcgcaaa gtcaacacaa gcctctccac cgtgtgtcca tgtttatgtg tatgcgctgt 60
 gccccgtcat gccacctgga cgcagggact ccagtgcct ctccctgcac aagcctctgc 120
 tggtttggga aagattggca tgacatcagc caagctctgg ccttgccctt tttccctccc 180
 ggaacccggc tggctcaaga tctgagccgt ggatctgcac ccactttggg gagttcctgc 240
 ccttgggcta gagtagaggc caagagtcaa agtgtggtgg gggctgagga agcaggatcg 300
 cttgagccca ggagttcaag gttagagtta tgtttgcac actgcattcc agcctgggta 360
 agagagcgag accctgcctc aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaagagtg gtgggggtag 420
 ggacagggag atgaggaagg cctacagtg gagaagcac caggaccaga acccagccct 480
 cccttgtctg aatcttgtg cccacaggag cctggacagt ggccagggaa ggttcgaatg 540
 ccacacaggt gagcttggcc tctgctctgt aggcagtggg aagtgtggg agttgggcat 600
 tctgtgagg cgcatagtca acattgtgag tagggctgga tgcagagctg tgagagggaa 660
 actagaagct ggaacatcta caggaggctt ttaagagaag cagagcgcc aggtgcagtg 720
 gctgacacct gtaatcccag cactttgggt ggccgagggg gtcagaacac ttgaggtcag 780
 gagttcgaga ccagggtgac 800

<210> 10
 <211> 935
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 10
 cacggtacca caggaggcaa aggaccacc atggaatcca ccaggagggg ccaggacagg 60
 ggactcaggg gcctcagcct gcactcact gctcagcaga gctgagctca gggcataacg 120
 tcagcttctt gggcagaaga gctgccaaaa tcaaagcttt gctagtccga aaattccttg 180
 ggaatgttga gcaaggccac cactgacatc atgtgcaaat tcgacagacag cctctgcacc 240

```

taaggctact cagacccaca gccttggtc gatgggggtgg cagactctgt atgccaccag 300
cacacccacc cacagggcag aggggtcagg acatagaato agacaggccc cagggacccc 360
agtgaagatt ataggcagcc attcccdact caacagagga gaaggtcaga gcccaagtctg 420
acattccccc atccctcttc cataacccc atgcactctgg cagtcagaca ggccctaagct 480
aaacctttcc ccccagcta cccaccaggg tcacccccc gccaggtcag ggccaatgga 540
ggttggggtg gagaagacag gcttgccctt atttctgccc caactcagaa ccttctgggt 600
tctgccacag gatgccttgc aagcttctcg gggtcactgt gggcagctgg gtgagctaag 660
ttcatctgtg ctgacctgac ctctgtgcag atgcataag aacacagagt gctccggggt 720
taggatgagg gcagcgctga taaggttcat ggaaccagt acagagcaca cagctgccca 780
cagagtcaact cccctgtgcc ccagcctgga cactcagct cctctcaac ccttcccca 840
ggtgctagat gtatatggga ccagaaagcc cctctgtgt cctctgtgt gagagcccag 900
ctgcttaggt gtttgtgact ctgggctcag agggg ;) 935

```

```

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 正向PCR引物

```

```

<400> 11
ggggaccagt ccagtcagaa ccttc 25

```

```

<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 反向PCR引物

```

```

<400> 12
ccgctcgagt tttctgagtc catgaca 27

```

```

<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 正向PCR引物

```

```

<400> 13
ggggtaaccgt ggctggggtg gcatgg 26

```

```

<210> 14
<211> 27
<212> DNA

```

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向PCR引物

<400> 14

ccgctcgaga tcataggagg gagcagg

27

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向PCR引物

<400> 15

ggagggaactc gacacgatac caacatagca at

32

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向PCR引物

<400> 16

ctatgttggt atcgtgtcga gttcctccct

30

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向PCR引物

<400> 17

gaattcgcca actgcagcca ggcgtgcc

28

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向PCR引物

<400> 18

cagcctggct gcagttggcg aattctcctc

30

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向PCR引物

<400> 19 ccccacgcag cccacccgct cggctgaact cgt	33
<210> 20 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向PCR引物	
<400> 20 gtggggctgc gtggggcagc agagaaagtt cagg	34
<210> 21 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向PCR引物	
<400> 21 gaattcacag ccatgggtgaa gatcagc	27
<210> 22 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向PCR引物	
<400> 22 ccatggctgt gaattcagtc acgag	25
<210> 23 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向PCR引物	
<400> 23 gttttaaagct ggcactgtcc caaa	24
<210> 24 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向PCR引物	
<400> 24 ctttggcaca gtgccagctt taaac	25

<210> 25
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探针

<400> 25
ttccgccata acgacgtcaa ccatctt 27

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向PCR引物

<400> 26
gcagggtgcc aaaacacat 19

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向PCR引物

<400> 27
tcgatggatc agactttctc aaca 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探针

<400> 28
tggcgtgccc attgatcaca attt 24

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向PCR引物

<400> 29
ggtcacgctc ctggaagata gt 22

<210> 30
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向PCR引物

<400> 30

gggcactgtc aaggctgaga

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向PCR引物

<400> 31

cgggcagcag gtcgaggaga

20

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向PCR引物

<400> 32

caggaaacggg catTTTgtag ca

22

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向PCR引物

<400> 33

aggccaggcg aattcaacga actcgggt

27

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向PCR引物

<400> 34

cgaGttcgtt gaattcgccT tggcctg

27

<210> 35

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向PCR引物

<400> 35
gccacacacc tgcagaggca gtgcaa 26

<210> 36
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向PCR引物

<400> 36
gcactgcctc tgcaggtgtg tggcttc 27

<210> 37
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向PCR引物

<400> 37
aattgcctc tgcaggtgtg tggcttc 27

<210> 38
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向PCR引物

<400> 38
gccacacacc tgcagaggcg aattca 26

<210> 39
<211> 240
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
tctggcagtc agacaggcct aagctaaacc ttccccccc agctaccac cagggtcate 60
cccaagccag gtcagggccca atggagggtg ggggtggagaa gacaggcttg gccctatttc 120
ctgcccact cagaaccttc tggtttctgc cacaggatgc cttgcaagct tatcggggtc 180
actgtgggca gctgggtgag ctaagttcat ctgtgctgcc gtgacctctg tgcagatgca 240

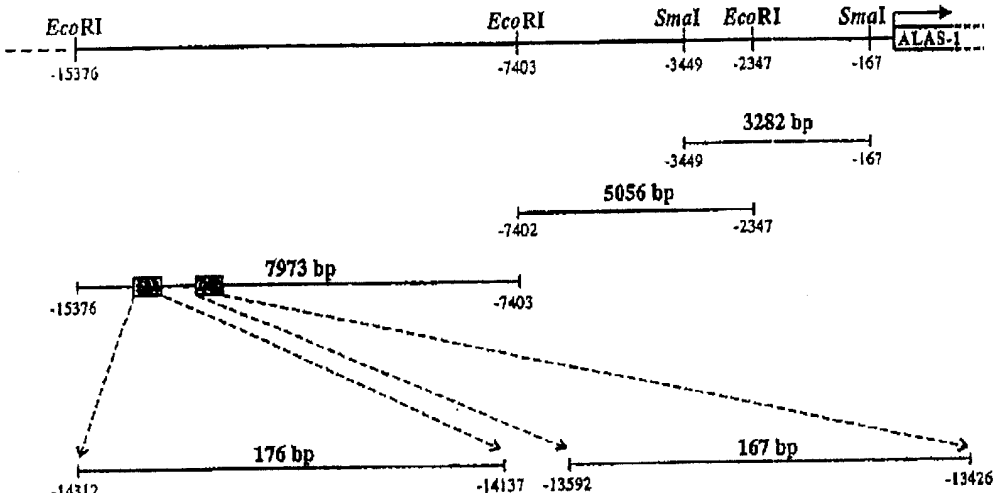


图 1A

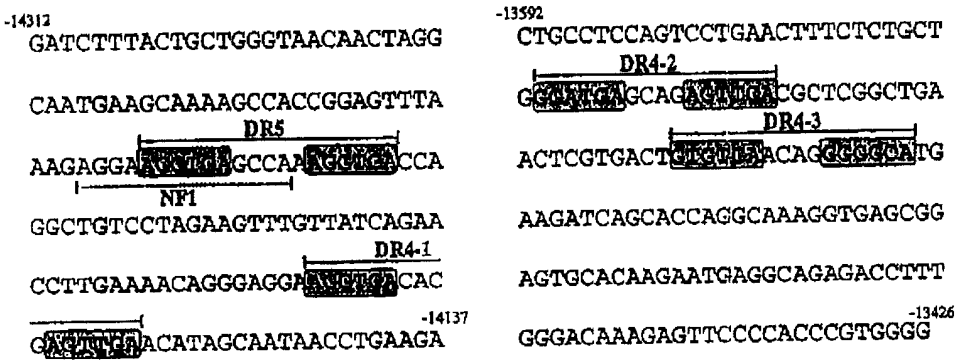


图 1B

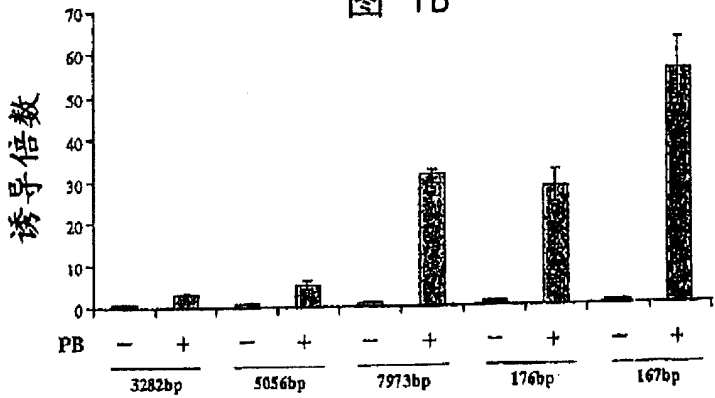


图 1C

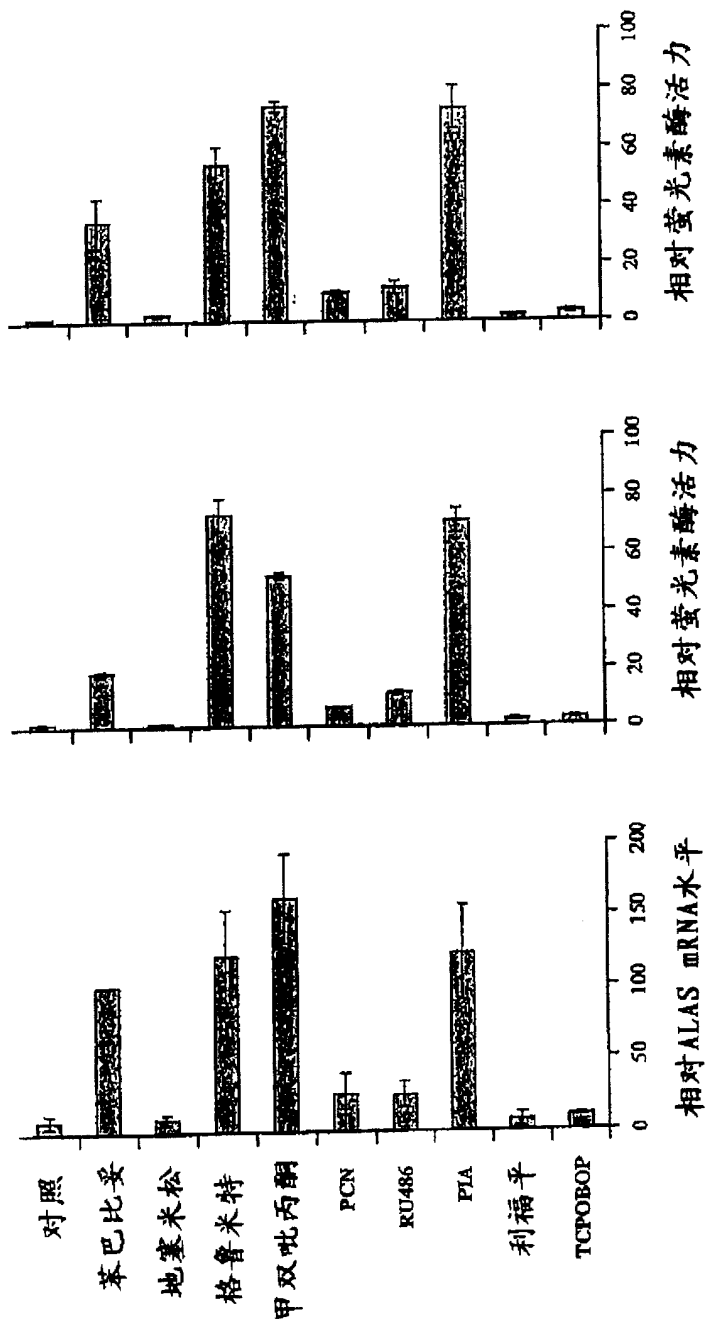


图 2

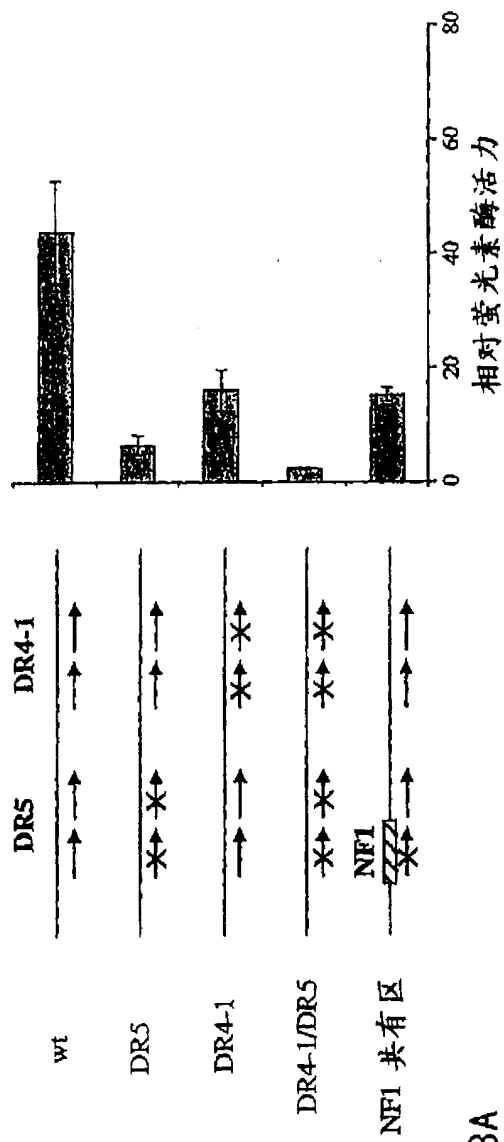


图 3A

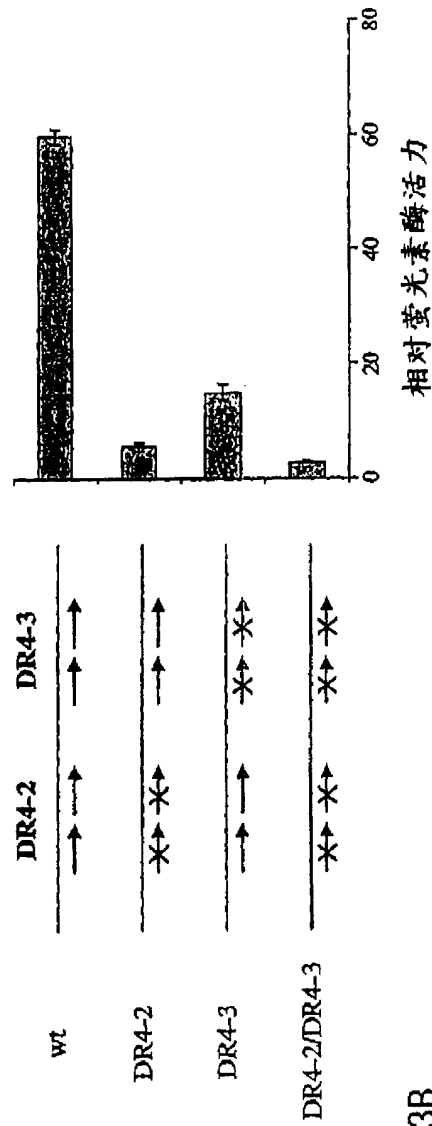


图 3B

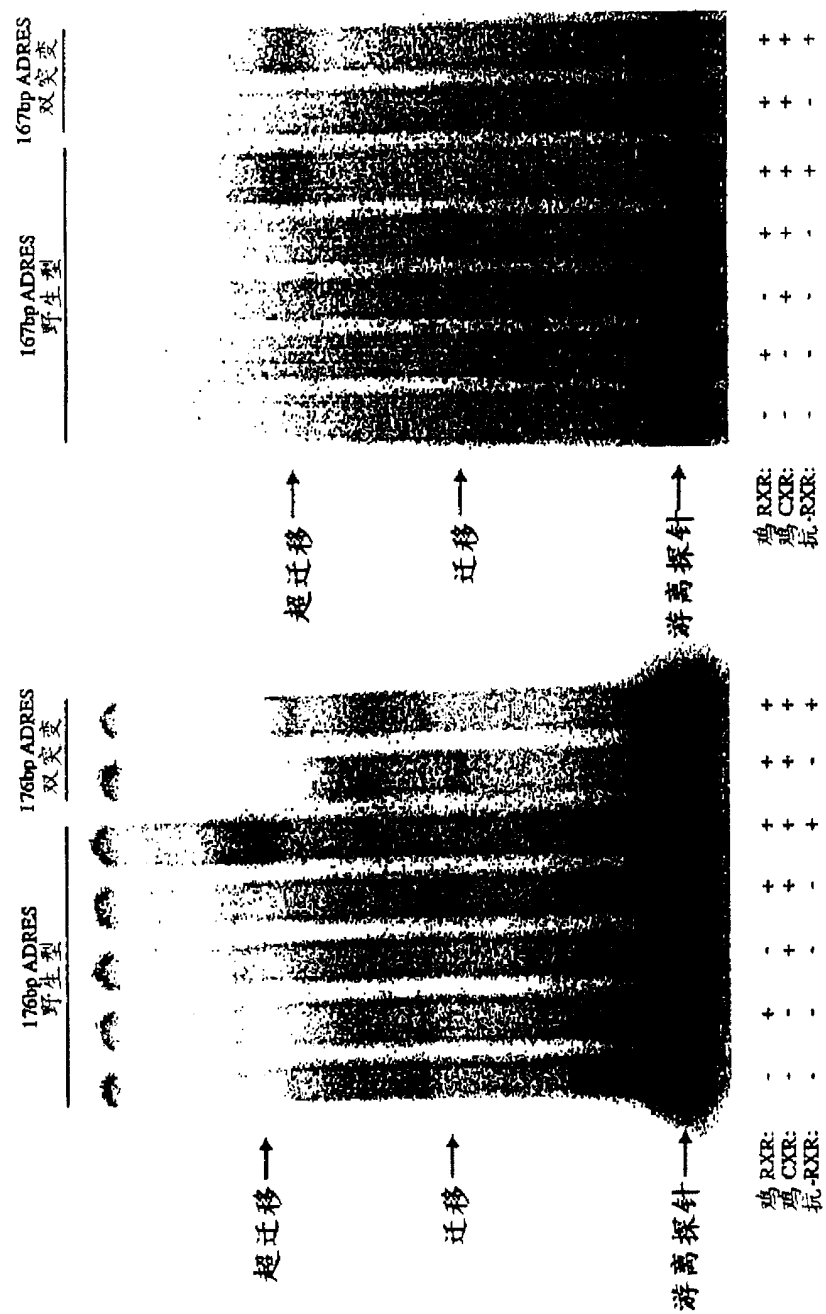


图 4B

图 4A

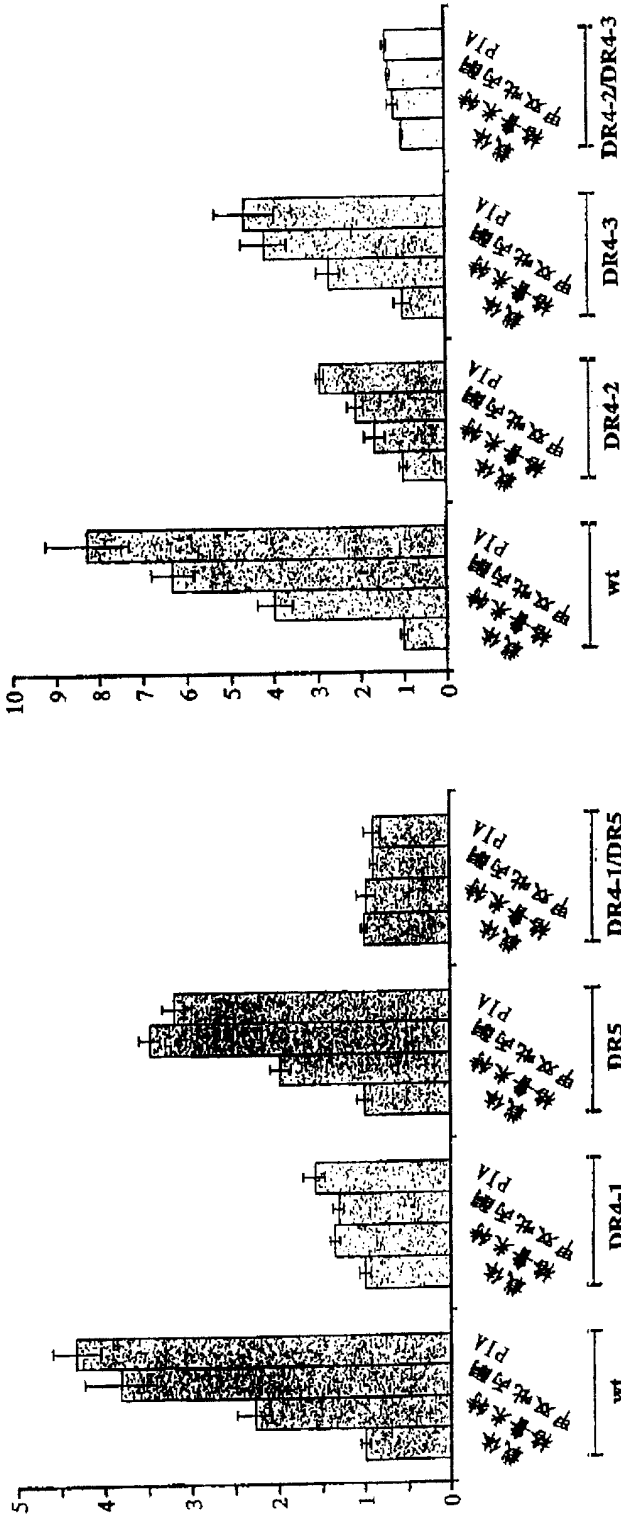


图 5A

图 5B

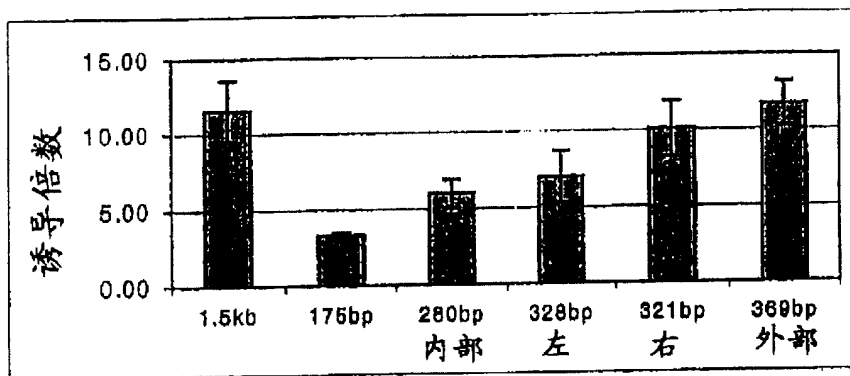


图 6

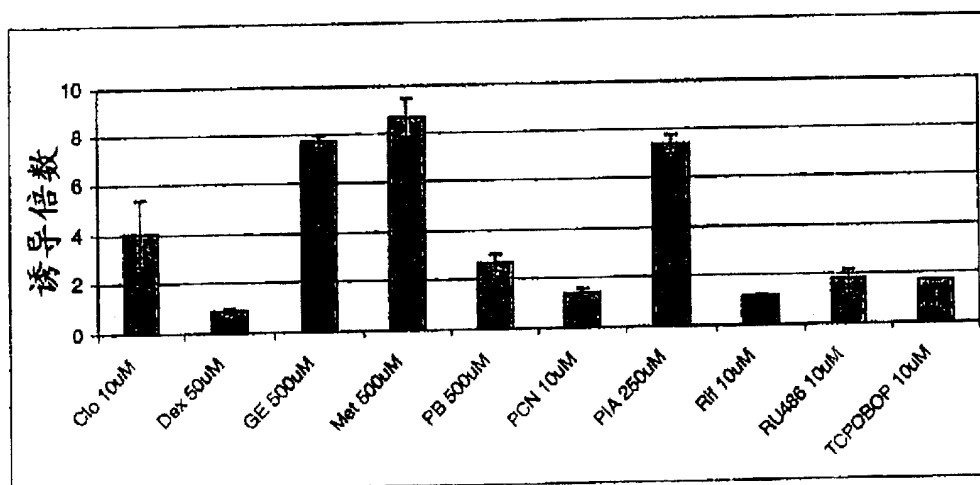


图 7

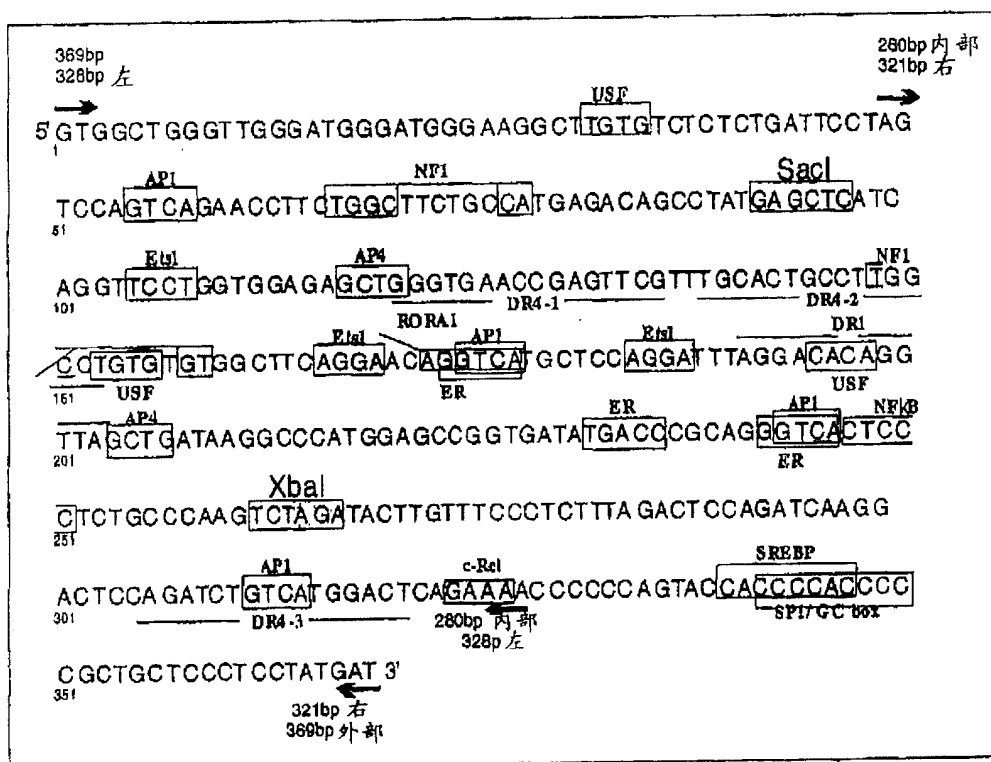


图 8

	DR4-1 序列	
	NR1	NR2
	→	→
WT	GGGTGAACCGAGTTCTG	
DR4-1/hs1	<u>AAGCTT</u> ACCGAGTTCTG	
DR4-1/hs2	GGGTGAACCGA <u>AAGCTT</u>	
DR4-1/hs1,2	<u>AAGCTT</u> ACCGA <u>AAGCTT</u>	
	DR4-2 序列	
	NR1	NR2
	←	←
WT	TGCACTGCCTTGGCCT	
DR4-2/hs1	<u>GAATTC</u> GCCTTGGCCT	
DR4-2/hs2	TGCACTGCCT <u>CTGCAG</u>	
DR4-2/hs1,2	<u>GAATTC</u> GCCT <u>CTGCAG</u>	

图 9

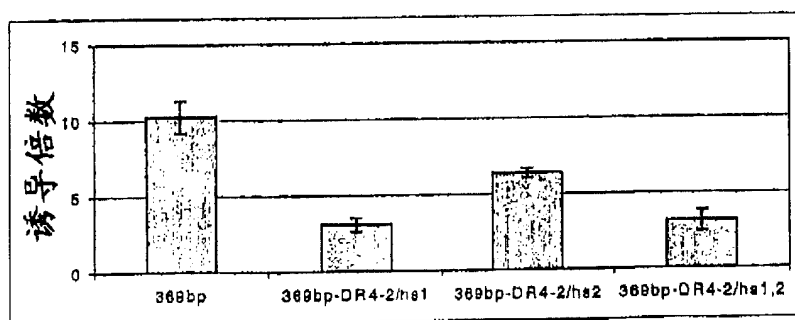


图 10

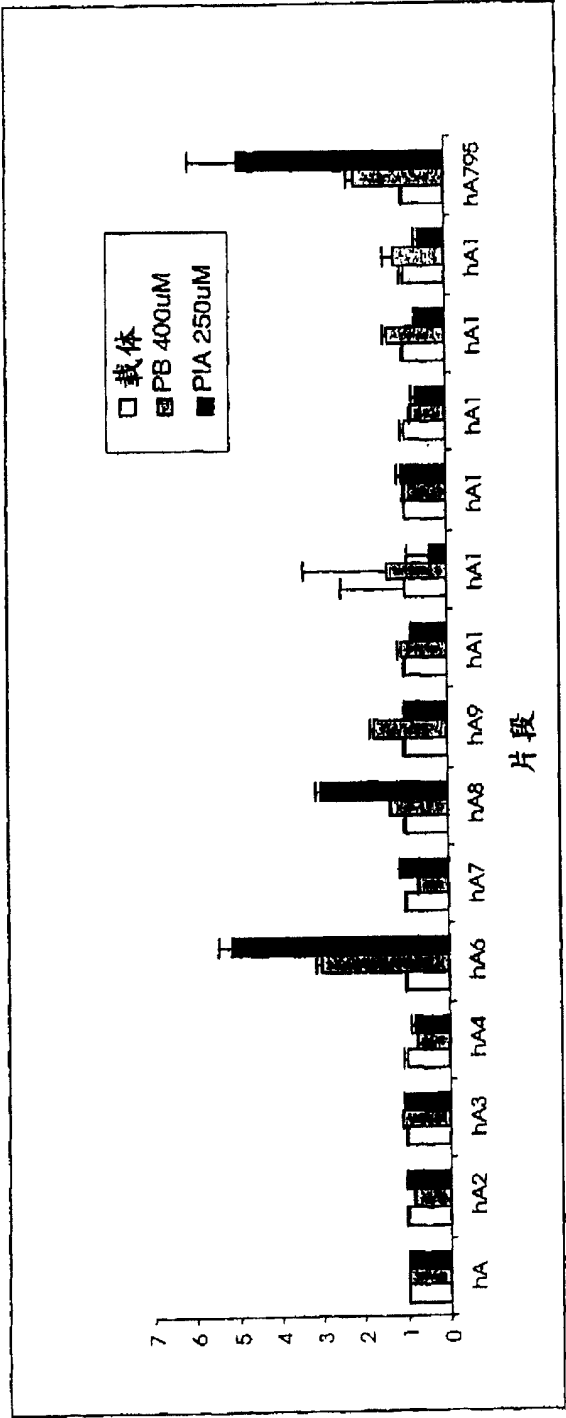


图 11

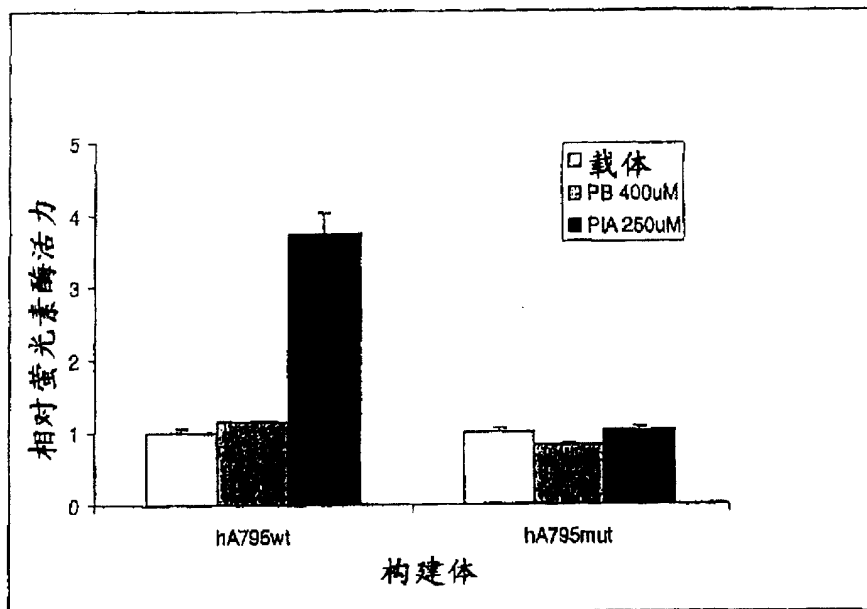


图 12

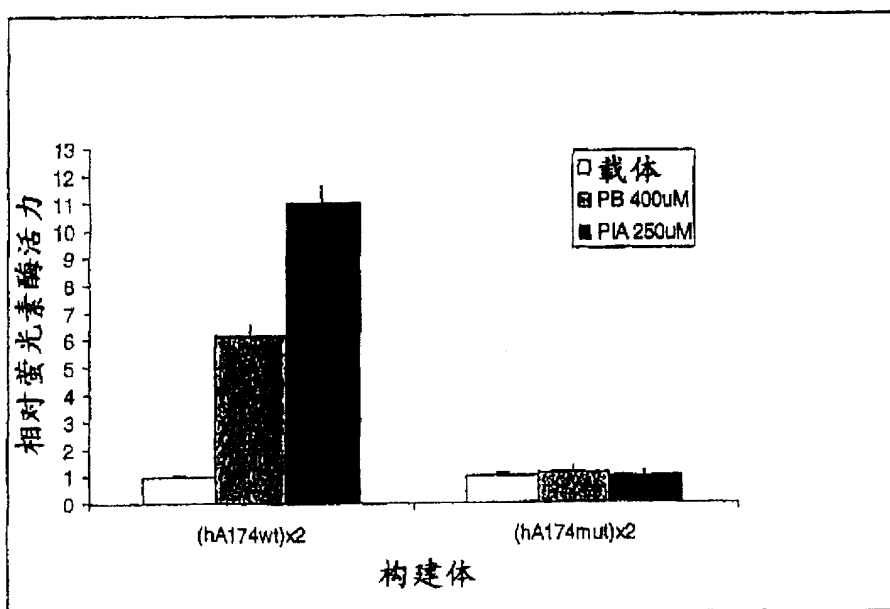
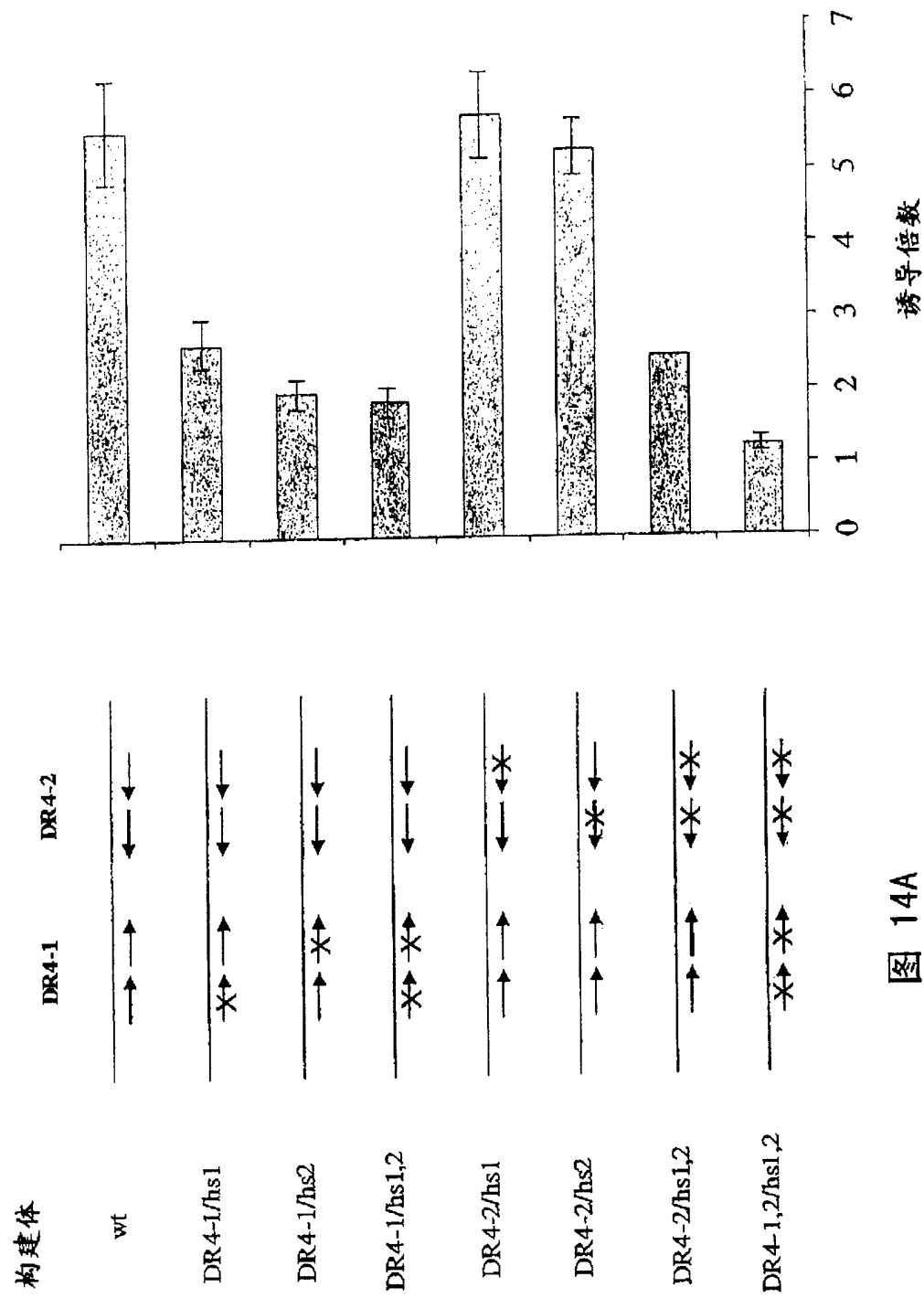
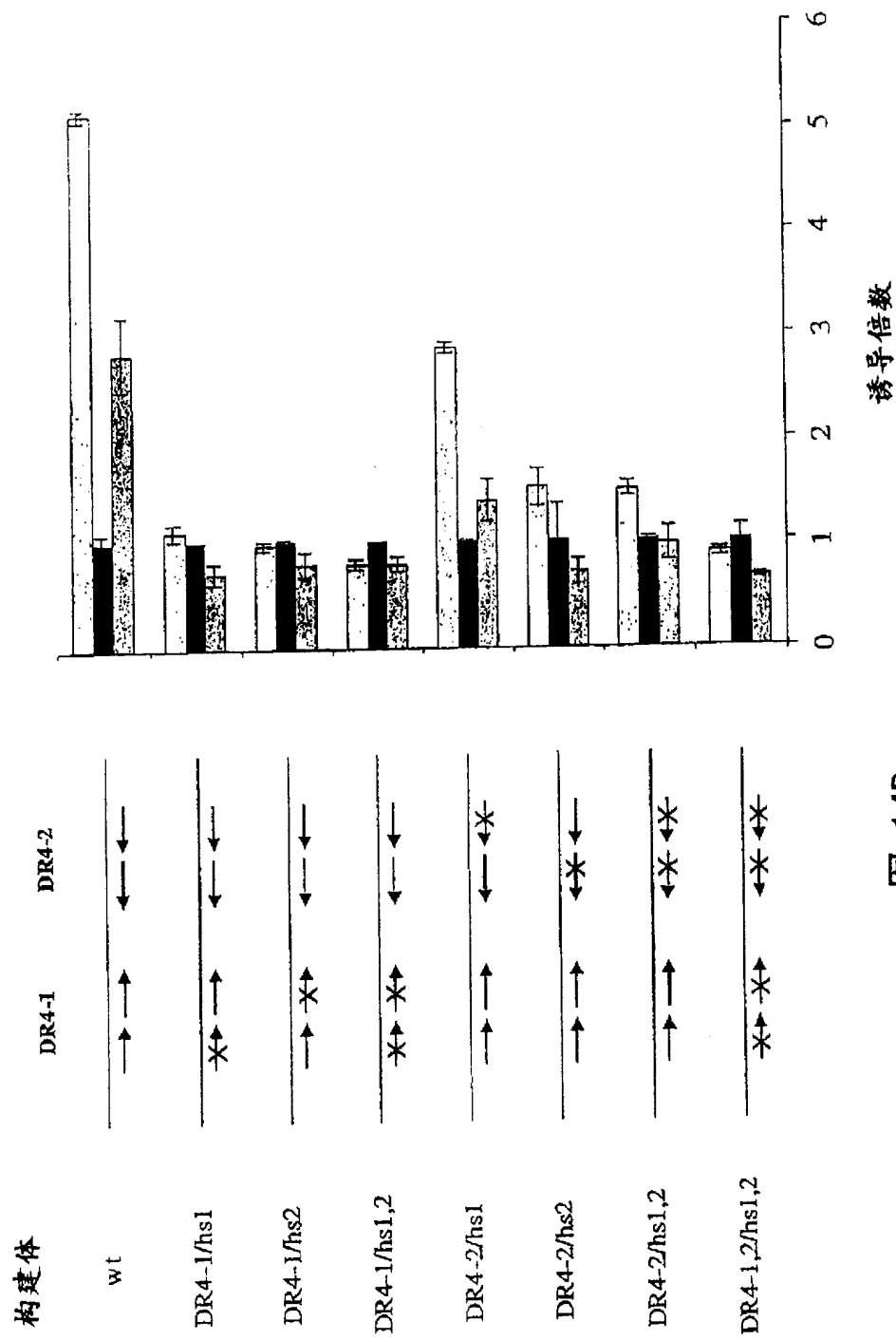


图 13





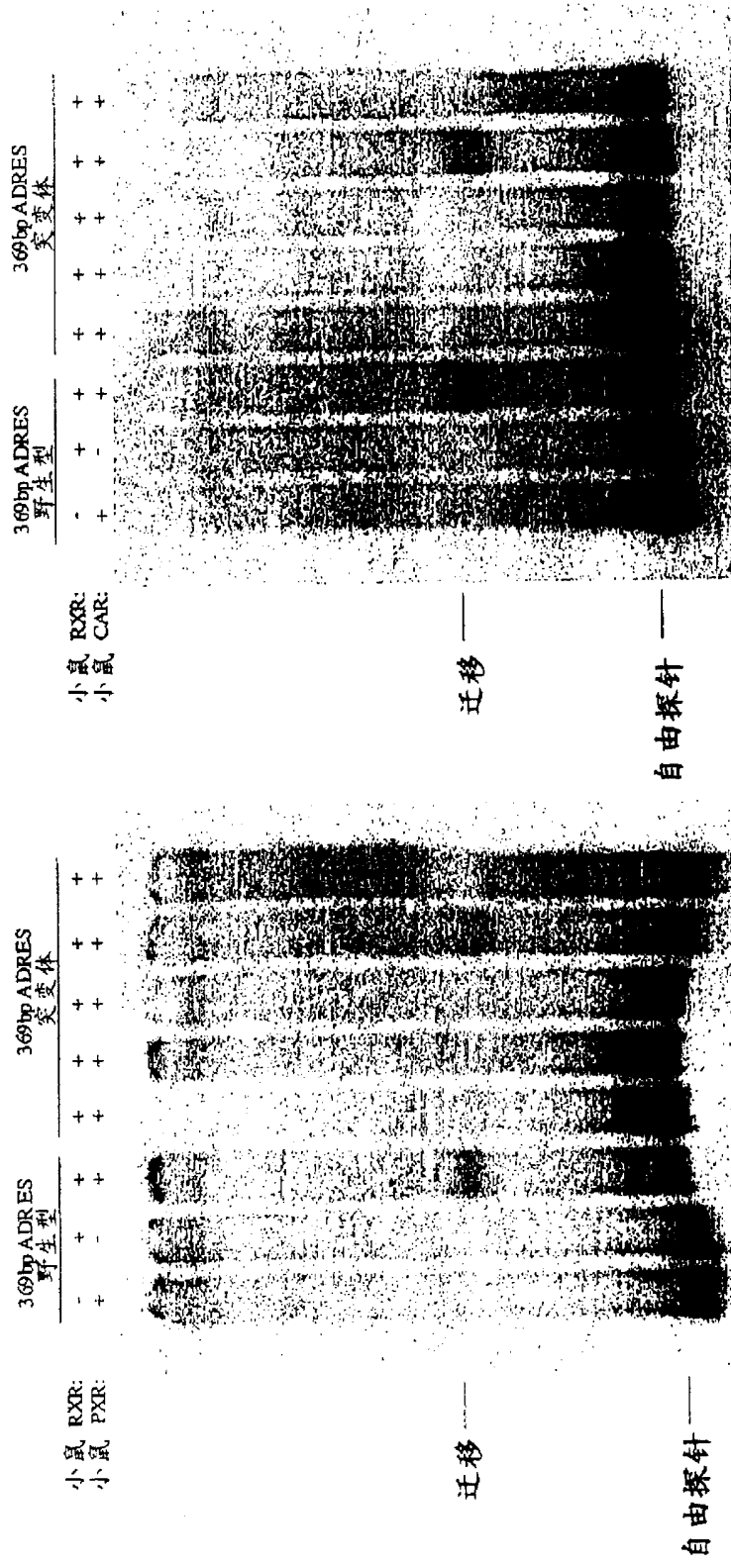


图 15A

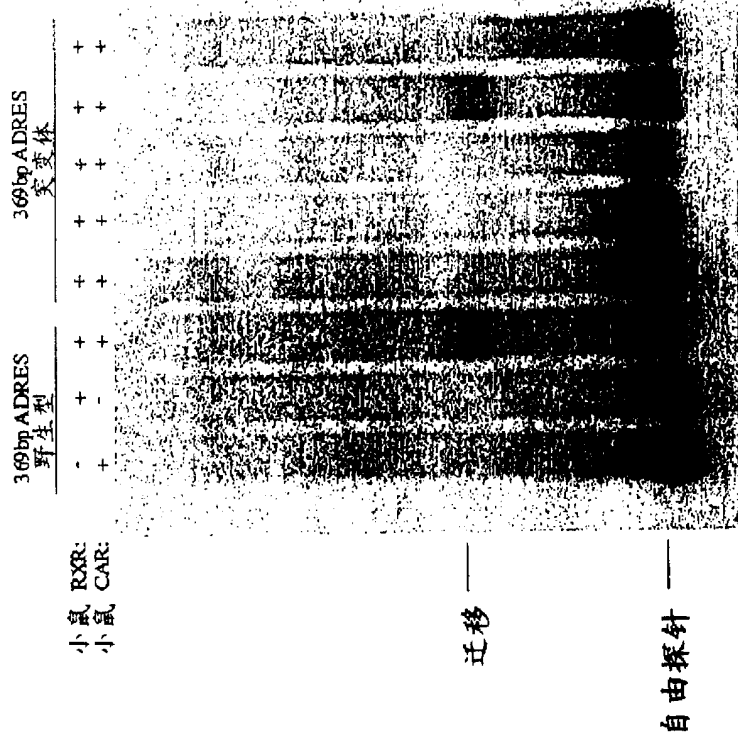


图 15B

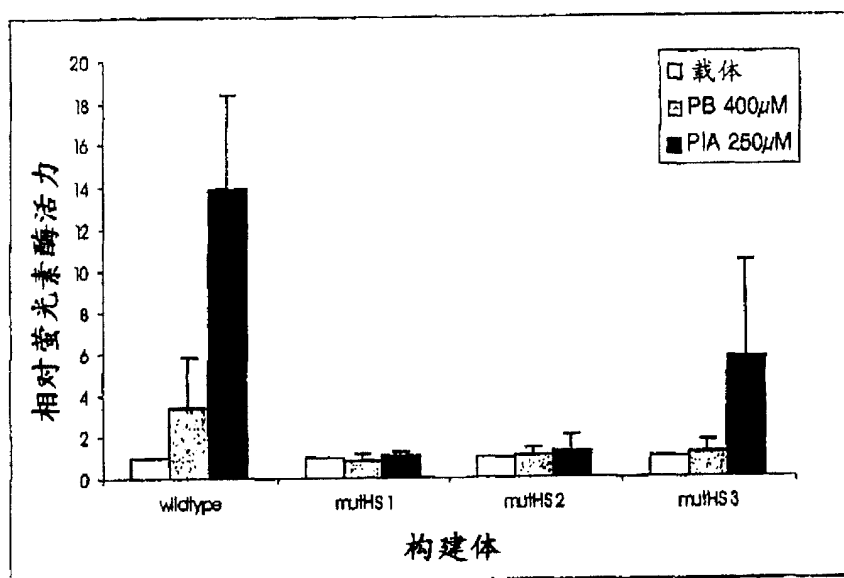


图 16

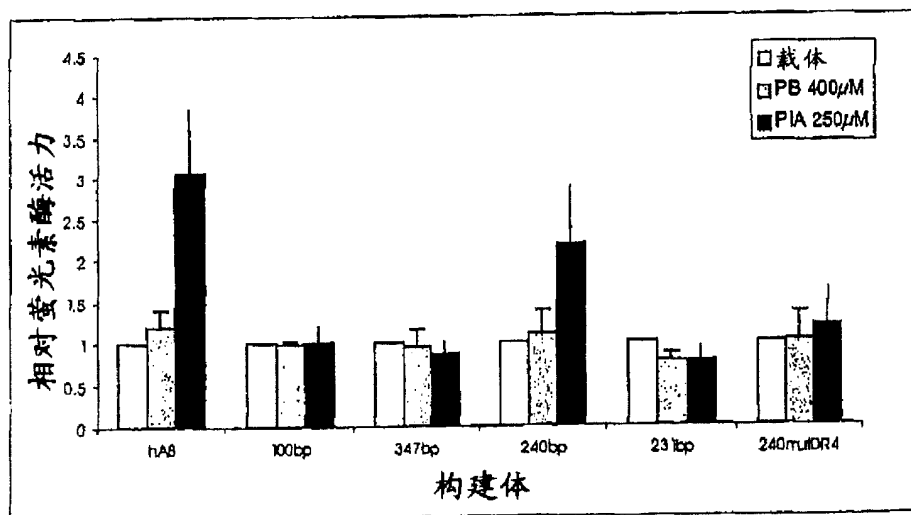


图 17

-20918
 GCGCAAAGTC AACACAAGCC TCTCCACCGT GTGTCCATGT TTATGTGTAT
 GCGCTGTGCC CCGTCATGCC ACCTGGACGC ~~AGGGACTCCA GTGACCTCTG~~ DR4 DR5
~~CTTGCACAG~~ HS1 HS2
~~CTTGCACAG~~ HS3 CCTCTGCTGG TTTGGGAAAG ATTGGCATGA CATCAGCCAA
 GCTCTGGCCT TGCCTTTTTT CCCT -20746

图 18A

-16122
 TCTGGCAGTC AGACAGGCCT AAGCTAAACC TTTCCCCCCC AGCTACCCAC
 CAGGGTCATC CCCAAGCCAG GTCAGGGCCA ATGGAGGTTG GGGTGGAGAA
 GACAGGCTTG GCCCTATTTT CTGCCCAACT CAGAACCTTC TGGTTTCTGC
 CACAGGATGC CTTGCAAGCT TATCGGGGTC ACTGTGGGCA GCTGGGTCAG
 DR4 DR5
~~CTAAGTTGAT~~ CTGTGCTGCC GTGACCTCTG TGCAGATGCA -16883

图 18B

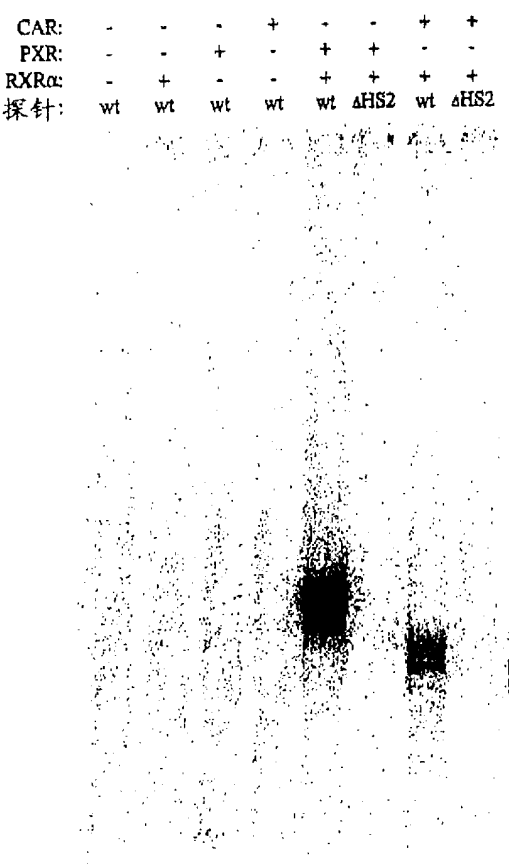


图 19A

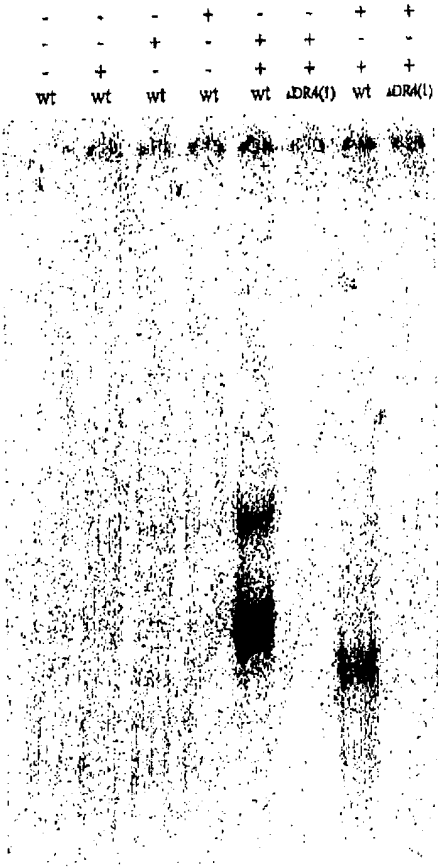


图 19B