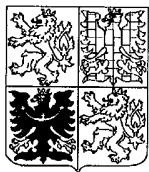


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.05.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.05.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/847218**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/08906**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/49289**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 280

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/11
C 12 N 15/67
C 12 N 15/85
C 12 N 15/90
C 12 N 5/10
C 12 N 1/21
C 07 K 14/47
A 01 K 67/027

(71) Přihlašovatel:

ICOS CORPORATION, S. E. Bothell,
WA, US;

(72) Původce:

Allison Daniel S., Seattle, WA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Transkripční regulační DNA z křeččího EF-1alfa

(57) Anotace:

Řešení se týká regulačních sekvencí DNA pocházejících z křeččího genu EF-1 α . Dále se řešení týká expresních konstruktů obsahujících výše uvedenou regulační DNA, hostitelských buněk transformovaných nebo fransfekovaných touto regulační DNA a způsobů zvyšování transkripce genu za použití této regulační DNA. Řešení se rovněž týká expresních konstruktů obsahujících výše uvedenou regulační DNA operativně připojenou ke specifickým genovým sekvencím.

01-11-99-Če

Transkripční regulační DNA křeččího EF-1 α

Oblast techniky

Vynález se týká regulačních sekvencí DNA pocházejících z křeččího genu EF-1 α . Dále se vynález týká expresních konstruktů obsahujících výše uvedenou regulační DNA, hostitelských buněk transformovaných nebo transfekovaných touto regulační DNA a způsobů zvyšování transkripce genu za použití této regulační DNA. Vynález se rovněž týká expresních konstruktů obsahujících výše uvedenou regulační DNA operativně připojenou ke specifickým genovým sekvencím.

Dosavadní stav techniky

Transkripce jakéhokoliv daného eukaryontního genu se provádí pomocí jednoho ze tří enzymů, RNA polymeras, z nichž každý účinkuje na konkrétní podsoubor genů. Zatímco transkripce velkých ribosomálních RNA probíhá pomocí RNA polymerasy I a malá ribosomální RNA a tRNA se přepisují RNA polymerasou III, DNA sekvence kódující proteiny a většina malých jaderných RNA jsou transkribovány RNA polymerasou II. U každého typu genu transkripce vyžaduje interakci příslušné polymerasy s promotorovými sekvencemi genu a vznik stabilního transkripčního iniciačního komplexu. Obecně je možno uvést, že transkripce od kterékoliv ze tří polymeras také vyžaduje interakci určitého vazebného faktoru s promotorovou sekvencí a rozeznání vazebného faktoru pomocí druhého faktoru, který tak umožní interakci polymerasy se sekvencí genu. Zatímco tento mechanismus je minimálním požadavkem transkripce katalyzované RNA polymerasami I a III, proces vedoucí k transkripci katalyzované RNA polymerasou II je složitější.

Vzhledem k rozsáhlému množství genových sekvencí transkribovaných RNA polymerasou II a vzhledem ke skutečnosti, že regulační schemata pro tyto geny jsou vysoce proměnlivá ve stejné buňce a liší se také od jedné buňky ke druhé, je transkripce katalyzovaná RNA polymerasou II je kromě interakcí jiných vazebných proteinů k regulačním sekvencím DNA, jiným než je promotor, ovlivněna vazbou řady transkripčních faktorů v iniciačním komplexu. Tyto jiné vazebné proteiny mohou sloužit pro aktivaci transkripce nad bazální hladinu nebo zcela potlačují transkripci. Připojení represoru lze rovněž považovat za prostředek jak zabránit aktivaci, vzhledem k tomu, že bazální transkripční hladina u vyšších eukaryotů je normálně velmi nízká. Na druhé straně, aktivace je obvyklou konečnou odpovědí na určitý fyziologický signál a vyžaduje buď odstranění represorového vazebného proteinu nebo alteraci v chromatinové struktuře, aby se umožnil vznik aktivního transkripčního iniciačního komplexu.

Jádrem vzniku transkripčního komplexu a nezbytnou podmínkou pro bazální hladinu exprese genu je promotorová sekvence, která je označována jako "TATA box" a která je umístěna před transkripčním startovacím místem polymerasy II. TATA box je vazebným místem pro všudypřítomný transkripční faktor označovaný jako TFIID, avšak jak již bylo uvedeno, transkripce od promotorové sekvence je u většiny genů silně ovlivněna dalšími regulačními oblastmi DNA, které mohou zesilovat nebo potlačovat transkripci genu. Elementy DNA tohoto typu jsou v různých polohách vzhledem ke kódující sekvenci v genu a vzhledem k TATA boxu. Tyto další transkripční regulační elementy často pracují tkáňově nebo buněčně specificky.

Při expresi rekombinantních proteinů je zvláště důležité zvolit regulační DNA, která obsahuje sekvenci

promotoru TATA a další regulační elementy kompatibilní s transkripčním aparátem hostitelské buňky. Z tohoto důvodu se obvykle dává přednost regulačním DNA, které jsou endogenní vzhledem ke zvolené hostitelské buňce. Značného úspěchu bylo také dosaženo za použití regulační DNA odvozené od sekvencí virového genomu, vzhledem k tomu, že rozmezí hostitelů je u virů široké a že byla prokázána aktivita virových regulačních DNA v různých typech buněk. Jako příklad virových regulačních DNA, jichž se běžně využívá pro expresi rekombinantního proteinu, je možno uvést promotor/zesilovač raného genu SV40 [Dijkema et al., EMBO J. 4: 761 (1985)], koncovou dlouhou repetici DNA viru Rousova sarkomu [Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 6777 (1982b)], fragmenty hovězího papillomaviru [Sarver et al., Mol. Cell. Biol. 1: 486 (1981)] a elementy promotoru/zesilovače lidského cytomegaloviru [Boshart et al., Cell. 41: 521 (1985)]. Přes široké rozmezí buněčných typů, na nichž byla demonstrována funkčnost virových regulačních DNA, je možné, že existují nevirové DNA elementy promotoru/zesilovače, které umožňují zvýšit transkripci rekombinantního proteinu ve specifických buněčných liniích prostřednictvím účinnějšího využití transkripčního aparátu hostitelské buňky.

V tomto oboru tedy existuje potřeba identifikovat sekvence regulační DNA promotoru/zesilovače, které fungují v homologních a heterologních typech buněk, přičemž účelem je zvýšení exprese rekombinantního proteinu a vysoký výtěžek požadovaného proteinového produktu. Zvláště důležitou potřebou je identifikovat takové regulační DNA promotoru/zesilovače, které mohou být s vysokou účinností využity v savcích buňkách, za účelem zvýšení produkce rekombinantních proteinů in vitro, které jsou glykosylovány podobným způsobem, jako je tomu u glykosylačních profilů, které jsou výsledkem exprese proteinu in vivo. U takto exprimovaných proteinů při terapeutickém nebo profylaktickém podávání existuje menší

pravděpodobnost že budou antigenní a větší pravděpodobnost, že budou fyziologicky účinné. Regulační oblasti DNA tohoto typu jsou také snadno insertovatelné do hostitelských buněk za účelem zvýšení exprese genů, které jsou endogenní vzhledem k hostitelským buňkám nebo genům dříve zavedeným do genomu hostitelské buňky, způsoby, které jsou v tomto oboru dobře známy a rutinně využívány.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou purifikované a izolované polynukleotidy odvozené z buněk křečka, které regulují transkripci genu. Tyto polynukleotidy zahrnují regulační DNA sekvence od 5' konce do translatované oblasti genu EF-1 α vaječníků čínského křečka. Přednostní DNA podle vynálezu je označována jako CHEF1 regulační DNA a obsahuje přibližně 3,7 kb DNA, která sahá od restrikčního místa SpeI do iniciačního methioninového kodonu (ATG) proteinu EF-1 α . Předmětem vynálezu jsou rovněž polynukleotidy o méně než 3,7 kb, pokud jsou tyto menší fragmenty polynukleotidů schopny zvyšovat transkripci operativně připojeného genu. Aktivní fragmenty DNA podle vynálezu, definované schopností regulovat (tj. zesilovat) transkripci genu, jsou snadno identifikovatelné delečními studiemi, které jsou v tomto oboru dobře známé a běžně využívané. Regulační DNA podle vynálezu zahrnuje polynukleotidy izolované z přírodních zdrojů, jako buněčných kultur, jakož i polynukleotidy produkované enzymatickými nebo čistě chemickými syntetickými postupy. Podle jednoho provedení tedy vynález poskytuje způsob přípravy CHEF1 DNA z genomové knihovny. Alternativně může být DNA připravena enzymatickou syntézou, která například využívá polymerázové řetězové reakce (PCR), nebo čistě chemickou syntézou, při níž se postupně přidávají jednotlivé nukleotidy nebo se hybridizují a ligují překrývající se oligonukleotidy. Nejvýhodnější DNA sekvence je popsána v SEQ

ID NO: 1. Předmětem vynálezu jsou dále DNA sekvence, které za stringentních podmínek hybridizují s DNA popsanou v SEQ ID NO: 1. Stringentní podmínky zahrnují promytí v pufru obsahujícím asi 2X SSC a asi 0,1% SDS při asi 65°C nebo podmínky ekvivalentní.

Předmětem vynálezu je dále DNA plasmid obsahující regulační polynukleotidy CHEF1. Plasmidy podle vynálezu rovněž mohou obsahovat DNA sekvence kódující protein, který je předmětem zájmu, nebo RNA produkt, který je předmětem zájmu, operativně připojené k polynukleotidové sekvenci CHEF1. Dále je předmětem vynálezu hostitelská buňka transformovaná, transfekovaná a/nebo elektroporovaná polynukleotidem nebo plasmidem podle vynálezu. Plasmidová DNA podle vynálezu může být zavedena do genomu hostitelské buňky nebo se v buňce může vyskytovat ve formě uzavřeného kružnicového plasmidu. Jako přednostní plasmidy podle vynálezu, které jsou zvláště přístupné pro zavedení požadované DNA sekvence, je možno uvést plasmidy pDEF14 a pDEF2. Bakteriální hostitelská buňka transformovaná pDEF14 byla uložena ve sbírce American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 9. dubna 1997 pod přírůstkovým číslem 98389 a bakteriální hostitelská buňka transformovaná pDEF2 byla uložena ve sbírce American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 4. března 1997 pod přírůstkovým číslem 98343.

Předmětem vynálezu je také lineární DNA vektor obsahující polynukleotid CHEF1. Vektor podle vynálezu je možno získat z virového zdroje nebo ho lze syntetizovat in vitro. Předmětem vynálezu je dále hostitelská buňka transfekovaná nebo elektroporovaná se sekvencí lineárního vektoru. DNA tohoto typu je zvláště užitečná pro expresi sekvence heterologního genu operativně připojené k DNA sekvenci CHEF1 nebo pro místně cílenou homologní rekombi-

20.10.99

naci, při níž sekvence CHEF1 může být zavedena do genomu hostitelské buňky za účelem modulace exprese operativně připojené sekvence.

Dále je předmětem vynálezu molekula chimérické rekombinantní DNA, kde je CHEF1 DNA operativně připojena (tj. podněcuje transkripci) k sekvenci genu kódující požadovaný proteinový produkt. Chimérické molekuly jsou obecně molekulami, které obsahují domény, jež se normálně nevyskytují ve spojení s prostředím divokého typu. Chimérická DNA podle vynálezu může zahrnovat část nebo celou regulační DNA CHEF1 v asociaci s DNA sekvencí, která je odlišná od genu pro křeččí protein EF-1 α . Jako proteinové produkty kódované chimérickými molekulami je možno uvést fyziologicky aktivní proteiny, části nebo podjednotky aktivních proteinů, jakož i markerové nebo reporterové proteiny. Polynukleotidová sekvence kódující proteinový produkt může být odvozena od komplementární DNA (cDNA), genomové DNA, syntetické DNA nebo DNA odvozené kombinacemi molekul těchto typů. Proteinové produkty mohou být endogenní (tj. normálně se nalézají v genomu CHO bez transformačního, transfekčního nebo podobného zavedení DNA) vzhledem k buňkám vaječníků čínského křečka (CHO). Kromě toho proteinové produkty mohou být kódovány exogenními zdroji, přičemž exogenním zdrojem je zdroj odlišný od genomu buňky CHO, jako je například syntetická DNA. Jako přednostní chimérické molekuly podle vynálezu je možno uvést molekuly, v nichž je DNA CHEF1 operativně připojena k DNA kódující: (i) těžký řetězec anti-ICAM3 protilátky ICM3, (ii) lehký řetězec ICM3, (iii) těžký řetězec anti-CD11/CD18 protilátky hu23F2G, (iv) lehký řetězec hu23F2G, (v) chitinasu, (vi) acetylhydrolasu faktoru aktivujícího destičky (PAF-AH) a (vii) chemokin odvozený od makrofágu (MDC). Bakteriální hostitelské buňky transformované plasmidovou DNA, které obsahují chimérické molekuly (i) až (vii), byly uloženy ve sbírce American Type Culture

Collection 1. dubna 1997 pod přírůstkovými čísly: (i) 98381, (ii) 98382, (iii) 98383, (iv) 98384, (v) 98385, (vi) 98386 a (vii) 98387.

Předmětem vynálezu je dále hostitelská buňka transformovaná nebo transfekovaná DNA CHEF1 podle vynálezu. Přednostní hostitelská buňka podle vynálezu je odvozena z buňky čínského křečka (Circetulus griseus), o jejíž regulační DNA CHEF1 by se předpokládalo, že poskytne vyšší úroveň exprese proteinu. Předmětem vynálezu jsou však také další typy buněk odvozených z jiných druhů, jako například z buněk arménského křečka (Cricetulus migratoris) nebo syrského (zlatého) křečka (Mesocricetus auratus), jakož i typy buněk odvozené od buněk jiných živočišných rodů. Buňky mohou být získány z plic, vaječníku, peritonea, svalů, sleziny, ledvin, melanomu nebo somatického zdroje, jakož i z celého zárodku nebo celého embrya. Hostitelské buňky podle vynálezu uvedené výše, jakož i další typy buněk, například myelomatické buněčné linie, o jejichž regulační DNA CHEF1 by se předpokládalo, že poskytnou vysokou úroveň transkripce, je možno získat ze sbírky American Type Culture Collection nebo je možno je napěstovat přímo z živočišného zdroje.

Rekombinantní molekuly podle vynálezu, které obsahují regulační DNA CHEF1 umožní zvýšenou úroveň exprese mRNA operativně připojených heterologních polynukleotidů (tj. těch které se bez transfekčního, transformačního nebo podobného zavedení v hostitelském genomu normálně nenacházejí). V závislosti na povaze polynukleotidu připojeného k sekvencím polynukleotidů CHEF1, by zvýšená transkripce vedla ke zvýšeným úrovním polypeptidů nebo zvýšeným úrovním různých druhů RNA v případech, kdy připojený polynukleotid kóduje například transferovou RNA, ribosomální RNA, malou jadernou RNA apod. Takovým druhem RNA také může být kódující RNA

20.10.99

komplementární k mRNA získané transkripcí endogenní nebo exogenní genové sekvence. Zvýšená translace polypeptidu bude nezbytně záviset na přítomnosti vhodných translačních signálů přítomných v mRNA.

Předmětem vynálezu je dále způsob zavádění DNA CHEF1 do specifických míst genomové DNA hostitelských buněk za účelem zvýšení úrovně transkripce endogenní genové sekvence. Pro zavedení celé nebo části DNA CHEF1 je možno použít homologní rekombinaci. V hostitelských buňkách, které jsou modifikovány tímto způsobem, je DNA CHEF1 operativně připojena ke kódujícím sekvencím DNA (viz například mezinárodní přihlášky PCT WO/94/12650, WO 92/20808 a WO 91/09955. Předmětem vynálezu jsou tedy nezbytně také sekvence alterované genomové DNA se zavedenou regulační DNA CHEF1.

Alternativně je předmětem vynálezu hostitelská buňka, v níž je exogenní DNA insertována v sousedství a v operativní poloze vzhledem k DNA CHEF1 přítomné v genomu. Hostitelské buňky tohoto typu zahrnují CHO buňky a insertovaná sekvence buď nahrazuje DNA kódující EF-1 α nebo je tato sekvence vložena mezi regulační DNA CHEF1 a DNA kódující EF-1 α . Do rozsahu vynálezu také spadají i jiné hostitelské buňky než CHO, do jejichž genomu byla dříve insertována DNA CHEF1 a poté do operativně připojené polohy insertována další DNA.

Předmětem vynálezu je dále způsob zvyšování transkripce požadovaného genu, jehož podstata spočívá v tom, že se do hostitelské buňky zavede polynukleotid zahrnující křeččí regulační sekvenci EF-1 α tak, že se tato regulační sekvence začlení do genomové DNA hostitele v operativně připojené poloze vzhledem k požadovanému genu. Dále do rozsahu vynálezu spadá způsob zvyšování transkripce požadovaného genu, jehož podstata spočívá v tom, že se do

20.10.99

hostitelské buňky zavede polynukleotid zahrnující křeččí regulační oblast EF-1 α a zaměřovací oblast, přičemž tato zaměřovací oblast je sestavena tak, že umožňuje integrovat regulační oblast v místě operativně připojeném k požadovanému genu kódujícímu protein odlišnému od EF-1 α . Do rozsahu vynálezu také spadá způsob zvyšování transkripce genů, které jsou endogenní vzhledem k CHO buňkám, jakož i způsob zvyšování transkripce genů, které jsou exogenní vzhledem k CHO buňkám.

Rekombinantních molekul podle vynálezu je možno využívat pro produkci transgenních živočichů, při níž se do vyvíjejícího se zárodku nebo somatické buňky živočicha zavede chimérická rekombinantní DNA obsahující DNA CHEF1 operativně připojenou k sekvenci DNA, která je předmětem zájmu. Chimérické rekombinantní molekuly je možno zavádět například mikroinjekcemi, a pokud se použije zárodečných buněk, mohou všechny buňky výsledného živočicha obsahovat rekombinantní DNA podle vynálezu. Alternativně lze chimérickou rekombinantní DNA podle vynálezu zavádět do buněk embrya, a v tomto případě DNA podle vynálezu může obsažena ve velkém počtu buněk výsledného živočicha.

DNA CHEF1 je rovněž užitečná při identifikaci blízce příbuzných regulačních oblastí DNA, které mohou poskytovat expresi genu vyšší a dlouhodobější, než jakou umožňuje CHEF1. Podobně, znalost sekvencí DNA CHEF1 umožní sestrojit syntetické DNA buď syntézou de novo nebo jednoduchou nebo několikanásobnou modifikací sekvencí CHEF1, přičemž výsledné syntetické DNA budou mít sekvence podobné sekvenci CHEF1, avšak budou schopny poskytnout vyšší úroveň transkripce genu.

Následuje podrobnější popis vynálezu.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. V příkladu 1 je popsáno klonování křeččího genu EF-1 α a příbuzné regulační DNA CHEF1. Příklad 2 se týká subklonování a sekvenční analýzy regulační oblasti CHEF1. V příkladu 3 je charakterizován polynukleotid promotoru CHEF1 a v příkladu 4 je popsán způsob sestavení různých expresních vektorů obsahujících DNA CHEF1. V příkladu 5 je popsáno transfekční stanovení pro zjištění účinnosti regulační DNA CHEF1. V příkladu 6 je podrobně popsáno porovnání úrovní exprese rekombinantního proteinu za použití buď regulační DNA CHEF1 nebo promotoru cytomegaloviru (CMV). V příkladu 7 jsou zkoumány rozdíly v regulační kapacitě DNA CHEF1 o různých délkách.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Klonování CHEF1

Při pokusu izolovat křeččí homolog lidského genu EF-1 α se DNA genomová knihovna buněk vaječníku čínského křečka (CHO-K1) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) podrobí screeningu s cDNA pro lidský EF-1 α .

Knihovna CHO-K1, částečně štěpená Sau3A v klonovacím vektoru Lambda FIX^(R)II, byla získána od firmy Stratagene (La Jolla, CA, USA) v hostitelské buňce kmenů XL-1-Blue MRA a XL1-Blue MRA (P2). Hostitelské buňky se připraví podle protokolu doporučeného výrobcem s modifikacemi, které jsou stručně popsány dále.

Buňky z glycerolového zásobního roztoku se v proužcích nanosou na LB misky, které neobsahují žádné antibiotikum. Pro inokulační kapalně LB médium se vyberou jednotlivé

20.10.99

kolonie a nechají růst do pozdní logaritmické fáze a optické hustoty OD_{600} asi 0,9. Poté se buňky skladují podle protokolu navrženého výrobcem nebo se jich bezprostředně použije způsobem popsaným dále.

Při přípravě kultur pro další kultivaci se jednotlivé kolonie sejmou z misek připravených výše popsaným způsobem a použije se jich pro inokulaci. Buňky se pěstují v 50 ml LB média doplněného 0,5 ml 1M síranu hořečnatého a 1 ml 10% maltosy v deionizované vodě. Buňky se pěstují přes noc při 30°C a sklídí centrifugací ve stolní centrifuze (2000 min^{-1} po dobu 5 minut při teplotě místnosti) a resuspendují v 10mM síranu hořečnatém při OD_{600} 0,5.

Fág lambda dodaný výrobcem se zředí v SM pufru (1 litr zásobního roztoku obsahuje 5,8 g chloridu sodného, 2,0 g hydrátu síranu hořečnatého, 50 ml 1M Tris-HCl, pH 7,5 a 5 ml 2% (hmotnost/objem) želatiny) na 10 až 10^5 násobné zředění. 2 μ l roztoku o každé koncentraci se přidají ke 400 μ l hostitelských buněk v 10mM síranu hořečnatém (OD_{600} asi 0,5). Výsledná směs se inkubuje 15 minut při 37°C, aby se umožnilo připojení fágu k buňkám a přidá se k ní vrchní agar (0,75% LBM agarosa o teplotě 48°C). Každá směs se dvojmo nanese na LBM agarosové misky. Z výsledků je zřejmý titr 3×10^6 jednotek tvořících plak (pfu)/ μ l fágového zásobního roztoku.

Připraví se čerstvé hostitelské buňky za použití výše popsaného postupu před prohledáváním knihovny. Přibližně 50 000 fágových pfu se přidá k 600 μ l hostitelských buněk (o OD_{600} přibližně 0,5) s 6,5 ml 0,75% LBM agarosy o teplotě 48°C. Směs se rozprostře na agarosové misky, které se poté inkubují přibližně 8 hodin při 37°C. Misky se poté 5 hodin chladí při 4°C, aby se zabránilo přilepení vrchní agarosy ke krycí vrstvě nitrocelulosity. Na misky se umístí membrány

20.10.99

BA-85 o velikosti pórů 0,45 μm (S+S, Keene, NH) a v přenosu se pokračuje po dobu 2 minut. Membrány se z misek odstraní a přenesená DNA se denaturuje 2 minuty v 1,5M chloridu sodném/0,5M hydroxidu sodném. Filtry se neutralizují 5 minut v 1,5M chloridu sodném/1,0M Tris-HCl (pH 8,0) a blotují na papír Whatman 3-MM a zahřívají za sníženého tlaku při 80°C po dobu asi 1,5 až 2 hodin.

Jako sondy pro prohledání knihovny se použije sekvence cDNA lidského EF-1 α [Uetsuki et al., J. Biol. Chem. 264: 5791 až 5798 (1989)], u níž se dříve ukázalo, že vykazuje 95% shodu s kódující oblastí CHO EF-1 α [Hayashi et al., J. Biochem. 106: 560 až 563, 1989], která se připraví následujícím postupem. 1,4kb sonda lidského EF-1 α se získá z plasmidu M0107, pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA, USA) vektoru obsahujícího cDNA lidského EF-1 α insertovaného v místě EcoRI. Za účelem prvního potvrzení, že plasmid M0107 obsahuje předpokládanou lidskou cDNA, se insert DNA sekvenuje s 3' a 5' vektorovými primery.

94-17 AGGCACAGTCGAGGCTGATC (SEQ ID NO: 2)

94-18 TTCCAGGGTCAAGGAAGGCA (SEQ ID NO: 3)

Prvních 263 párů bází insertu vykazuje více než 90% shodu s publikovanou sekvencí kódující lidský EF-1 α , a zatímco u 3' konce je přesné stanovení obtížné, malé úseky by mohly být ve shodě s předpokládanou sekvencí. Souhrnně tato shoda ukazuje, že plasmid kóduje požadovanou sekvenci.

Celý humánní insert se odstraní z plasmidu štěpením EcoRI a pás cDNA o 1,4 kb se dvakrát podrobí gelové purifikaci za použití soupravy QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit podle pokynů výrobce. DNA se eluuje 50 μl TE, výsledný roztok se zkoncentruje v zařízení Microcon-10 (Amicon,

20.10.99

Beverly, MA, USA) na 25 μ l, alikvot se označí ^{32}P - α -dTTP a ^{32}P - α -dCTP za použití soupravy pro značení Boehringer Mannheim Random Primed DNA podle pokynů výrobce. Značená sonda se purifikuje za použití rotující kolony G50, aby se odstranily nezačleněné nukleotidy. Při porovnání purifikovaná sonda vzhledem k nepurifikovanému alikvotu vykazuje 46% zavedení radioaktivní značky a 5×10^3 cpm/min/ μ l (cpm = počet impulsů za minutu).

Nitrocelulosové membrány připravené výše popsaným způsobem se zkoušejí následujícím postupem. Připraví se zásobní roztok prehybridizačního/hybridizačního pufru, který obsahuje 22,5 ml 20X SSC, 30,0 ml 50X Denhardtova roztoku, 3,0 ml 1M fosfátového pufru (pH 6,8) (69 ml 1M dihydrogenfosforečnanu sodného, 31 ml 1M hydrogenfosforečnanu sodného), 0,75 ml 20% SDS a 78,75 ml destilované vody. Za účelem prehybridizace se 1,4 ml 10 mg/ml DNA lososího sperma (Stratagene) vaří 5 minut s 0,6 ml destilované vody a poté přidá k 7 ml destilované vody a 72 ml zásobního roztoku pufru. Filtry se inkubují v prehybridizačním pufru minimálně 2 hodiny při 65°C.

Za účelem hybridizace se spojí 30 μ l sondy, 200 μ l 10 mg/ml DNA z lososího spermatu a 770 μ l destilované vody. Vzniklá směs se 5 minut vaří a přidá ke 36 ml zásobního pufru se 3 ml destilované vody. Z filtrů se odstraní prehybridizační roztok a nahradí se hybridizačním pufrem. Filtry se inkubují přes noc při 65°C, po hybridizaci se filtry 3 hodiny promývají při 65°C se třemi výměnami pufru obsahujícího 2X SSC a 0,1% SDS, a poté na 48 hodin podrobí autoradiografii.

47 kolonií identifikovaných jako pozitivní se zachytí do 1 ml SM pufru obsahujícího 20 μ l chloroformu. Za účelem vyřazení možných pseudogenů, kterým chybí jeden nebo

20. 10. 99

více intronů, se vytvoří páry PCR primerů tak, aby lemovaly vždy dva introny: primery 95-136 (SEQ ID NO: 4) a 95-137 (SEQ ID NO: 5) lemující introny 2 a 3; primery 95-138 (SEQ ID NO: 6) a 95-139 (SEQ ID NO: 7) lemující introny 3 a 4; primery 95-140 (SEQ ID NO: 8) a 95-141 (SEQ ID NO: 9) lemující introny 4 a 5; a primery 95-142 (SEQ ID NO: 10) a 95-143 (SEQ ID NO: 11) lemující introny 6 a 7.

95-136 (SEQ ID NO: 4) GCCACCTGATCTACAAATGT

95-137 (SEQ ID NO: 5) GAGATACCAGCCTCAAATTC

95-138 (SEQ ID NO: 6) ATGTGACCATCATTGATGCC

95-140 (SEQ ID NO: 8) GTTGAATGGTGACAACATG

95-141 (SEQ ID NO: 9) CAGGTTTTTAAAACACCAGTC

95-142 (SEQ ID NO: 10) AATGACCCACCAATGGAAGC

95-143 (SEQ ID NO: 11) ACAGCAACTGTCTGCCTCAT

Předpokládaná velikost PCR produktů za použití CHO EF-1 α DNA templátu je naložena na velikosti a umístění intronů v publikované sekvenci lidského EF-1 α . Každá PCR reakce zahrnuje 2 μ l fágu, 2,5 μ l každého vhodného páru primerů (100 μ g/ml), 2 μ l 2mM směsi dNTP, 2,5 μ l 10X PCR pufu (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA), 1,5 μ l 25mM chloridu hořečnatého, 0,125 μ l Taq polymerasy (5 jednotek/ μ l) (Perkin Elmer) a 11,8 μ l destilované vody. Amplifikace se provádí 4 minuty při 94°C, načež následuje 30 cyklů zahrnujících 1 minutu při 90°C, 2 minuty při 50°C a 4 minuty při 72°C. Amplifikační produkty se rozdělí na 1,2% agarosovém gelu za použití 1X TAE. U tří ze 47 pozitivních plaků bylo zjištěno, že kódují pravé geny (č. 2, 7 a 40) obsahující všechny introny. Tyto tři pozitivní vzorky se podrobí třetímu prohledávání za použití následujícího postupu. Výše popsáním postupem se připraví miskové kultury a pro každý ze tří pozitivních plaků se připraví

20.10.99

zásobní roztoky ve zředěních 10 až 10^5 . 20 až 50 izolovaných plaků z každého zásobního roztoku se podrobí prohledávání pomocí PCR s následujícími výsledky. Klon č. 2 vykazuje 2 pozitivní plak (označené jako 2.12 a 2.17) z celkem 22 plaků podrobených screeningu, klon č. 7 vykazuje 1 pozitivní plak (označený jako 7.44) z 50 prohledaných plaků a klon 40 vykazuje jeden pozitivní plak (označený jako 40.24) ze 40 plaků podrobených creeningu. Z každého z těchto čtyř vzorků se dále popsáním způsobem izoluje fágová DNA.

Hostitelské buňky XL-1 Blue MRA (P2) se v proužcích navzorkují na LB agarosové misky a nechají růst přes noc při 37°C. Vybere se jediná kolonie, kterou se zaočkuje 50 ml LB média (obsahujícího 0,2% maltosu a 10mM síran hořečnatý). Kultura se nechá růst přes noc při 30°C. Buňky se sklídí pětiminutovou centrifugací při teplotě místnosti při 2000 min^{-1} na stolní centrifuze a resuspendují v 50 ml 10mM síranu hořečnatého. Resuspendované hostitelské buňky (50 μl) se smísí se 100 μl zásobního roztoku každého z pozitivních fágů a vzniklá směs se inkubuje 15 minut při 37°C, aby se umožnil připojení fágu k buňkám. Ke směsi třepané 2 hodiny při 37°C se přidá asi 500 μl LBM média a poté dalších 200 μl hostitelských buněk. Vzniklá směs se inkubuje dalších 15 minut při 37°C. Přidá se vrchní agar (8 ml 0,75% LBM agarosy o 48°C), načež se směs nanese na misky a nechá růst přes noc při 37°C.

Poté se ke každé misce přidá 12 ml zředovacího roztoku lambda (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 10mM síran hořečnatý) a miskami se mírně kývá po dobu 2 hodin. Zředovací roztok se odstraní a 10 minut centrifuguje při 4000 x g ve stolní centrifuze. K supernatantu se přidá vždy 1 μl RNasy A o koncentraci 1 mg/ml a DNasy I o koncentraci 1 mg/ml. Vzniklá směs se inkubuje 15 minut při 37°C a přidá se k ní stejný objem srážecího pufru (20% polyethylenglykol 8000, 2M

chlorid sodný, 20mM Tris-HCl, pH 7,5, 10mM síran hořečnatý) a výsledná směs se 1 hodinu inkubuje na ledu a poté 20 minut centrifuguje při 8000 x g. Superant se odstraní, peleta se 10 minut suší na vzduchu při teplotě místnosti, resuspenduje v 500 μ l TE, krátce centrifuguje, aby se odstranily částice a supernatant se převede do čisté 1,65ml zkumavky epitube. Do zkuvky se přidá asi 2,5 μ 20% SDS (směs se 5 minut inkubuje při 65°C) a přidá se k ní 2,5 μ l proteinasy K o koncentraci 10 mg/ml (inkubace 1 hodinu při 65°C) a 10 μ l 5M chloridu sodného. Směs se extrahuje jednou stejným objemem směsi fenolu a chloforormu a jednou stejným objemem chloroformu. Po přidavku stejného objemu isopropylalkoholu a následné tříhodinové inkubaci při -70°C se směs 15 minut centrifuguje v epifuze při nejvyšší rychlosti. Získaná peleta se promyje 70% ethanolem, vysuší na vzduchu a resuspenduje ve 100 μ l TE.

P ř í k l a d 2

Subklonování regulačního úseku EF-1 α

Za účelem stanovení velikosti insertu DNA EF-1 α se fágová DNA připravená způsobem popsáním v příkladu 1 štěpí NotI a výsledné restriční fragmenty se rozdělí na 0,6% 1X TAE agarosovém gelu. Kromě předpokládaných lemuujících fragmentů lambda o délce 19 kb a 10 kb, klony 2.12 a 2.17 vykazují identické profily štěpení s pásy o 11 kb a 4,5 kb. Rovněž klony 7.44 a 40.24 vykazují profily štěpení shodné s pásy insertu o 12 kb a 7 kb, což spolu s údaji o štěpení klonů 2.12 a 2.17, dokazuje přítomnost vnitřního restričního místa NotI v DNA EF-1 α . Fragmenty insertu z klonů 2.12 a 7.44 se subklonují následujícím postupem.

Fágová DNA (60 μ l) připravená způsobem popsáním v příkladu 1 se štěpí NotI a štěpená DNA se vysráží přidavkem

20 μ l 3M octanu sodného a 400 μ l 100% ethanolu. Vysrážená DNA se shromáždí centrifugací, promyje ve 200 μ l 70% ethanolu, suší 15 minut na vzduchu a resuspenduje ve 20 μ l TE. Suspenze se 10 minut zahřívá na 65°C a přidají se k ní 2 μ l pufru pro elektroforézu. DNA se rozdělí elektroforézou na agarosovém gelu a pásy o 4,5 kb, 7 kb, 11 kb a 12 kb se odříznou ve formě agarosových řezů. Z každého agarosového řezu se za použití soupravy pro extrakci QIAGEN QIAquick podle pokynů výrobce extrahuje DNA. Čistota pásů a koncentrace se ověří oddělením 5 μ l alikvotu z každého izolovaného fragmentu na 0,6% 1X TAE agarosovém gelu.

Jednotlivé fragmenty se odděleně ligují k pBluescriptSW⁺ štěpenému NotI. Při ligacích 11 a 12kb fragmentů se před zavedením insertu fragmentu linearizovaný vektor ošetří telecí alkalickou fosfátasou. 2 μ l každého ligátu se použije pro elektroporaci 40 μ l elektrokompetentních buněk XL-1 Blue. Transformované buňky se nanese na misky s LBM/carb agarosou se 40 μ l 5% X-gal v dimethylformamidu (DMF) a 20 μ l 0,1M IPTG na misku. Buňky se inkubují přes noc při 37°C a ráno ochladí na 4°C, aby se zvýšila intenzita modré barvy.

Při druhém výběru se bílé kolonie naproužkují na misky s agarosou LBM/carb obsahující X-gal a IPTG výše popsáním způsobem a kolonie, které jsou následujícího dne bílé, se nechají růst ve 3 ml LBM/carb přes noc při 37°C. Plasmidová DNA z bílých kolonií pěstovaných přes noc se připraví za použití WIZARD Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) podle protokolu navrženého výrobcem.

Restrikční analýza izolované plasmidové DNA ukáže, že 4,5kb, 7kb a 12kb fragment se úspěšně ligoval k vektoru

pBluescript SW⁺ a výsledné plasmidy se označí jako pSK/EF.1.4.5, pSK/EF1.7 a pSK/EF1.12.

Každý z plasmidů se připraví za použití soupravy QIAGEN midi prep kit podle protokolu navrženého výrobcem. PCR se podrobí každý z nových vektorů, vytitruje se templátová DNA a použije se primerů kódující oblasti (SEQ ID NO: 4 až 11, jichž se používá v párech způsobem popsáným výše pro selekci pseudogenů postrádajících jeden nebo větší počet různých intronů). Titrace se provádí poté co se při vysokých koncentracích zjistí, že všechny tři fragmenty obsahují úplnou oblast pro EF-1 α , což naznačuje možnou křížovou kontaminaci tří plasmidových přípravků. Při titraci se PCR provádí v reakční směsi obsahující 2,5 μ l templátové DNA o koncentraci 0,001, 0,01, 0,1, 1 nebo 10 ng/ μ l a zahrnující 2,5 μ l 10X PCR pufru (Perkin Elmer), 2,0 μ l 2mM směsi dNTP, 1,5 μ l 25mM chloridu hořečnatého, 0,125 μ l Taq polymerasy (Perkin Elmer) a 11,4 μ l destilované vody. Amplifikace se provádí za následujících podmínek: 4 minuty při 94°C a poté 30 cyklů, z nichž každý zahrnuje 1 minutu při 90°C, 2 minuty při 50°C a 4 minuty při 72°C. Výsledky ukazují, že úplná oblast pro EF-1 α je umístěna v 4,5kb a 7kb fragmentu.

Pro každý insert se za použití soupravy Stratagene FLASH Nonradioactive Gene Mapping Kit určené pro použití s vektorem Lambda FIX II^(R) sestrojí restriční mapa. Namísto fágové DNA se však použije plasmidové DNA vyštěpené NotI z vektorů pSK výše popsáným způsobem. Pro sestrojení mapy se v podstatě použije protokolu navrženého výrobcem. Tento postup lze stručně popsat takto: plasmidy se sekvenují za použití primeru M13 (SEQ ID NO: 12) a reversního primeru M13 (SEQ ID NO: 13) (komplementárního k oblastem v mnohočetné klonovací oblasti pBluescript SW⁺), aby se lokalizovaly sekvence primerů T3 (SEQ ID NO: 14) a T7 (SEQ ID NO: 15) vnitřních vzhledem k místu NotI pro každý insert.

M13	GTAAAACGACGGCCAGT	(SEQ ID NO: 12)
M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG	(SEQ ID NO: 13)
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	(SEQ ID NO: 14)
T7	GTTAATACGACTCACTATAGGGC	(SEQ ID NO: 15)

Primerů T7 a T3 se použije jako sond pro protokol sestavení genové mapy. Jelikož se ukázalo, že insert EF-1 α obsahuje vnitřní místo NotI, předpokládá se, že páry fragmentů (4,5kb/11kb a 7kb/12kb) zahrnují jednu nebo druhou sekvenci primerů, a tedy se stanovilo, že 4,5 a 12kb insert obsahuje sekvenci primeru T7, zatímco 7kb insert má sekvenci T3.

4,5 a 7kb inserty obsahující oblast pro EF-1 α se vyštěpí z vektoru štěpením NotI. Štěpená DNA se oddělí na agarosovém gelu a oddělené fragmenty se z gelu odříznou. Z každého agarosového řezu se za použití soupravy pro extrakci QIAGEN QIAquick podle pokynů výrobce izoluje DNA. Mapování se provádí za použití sedmi různých enzymů při částečném restrikním štěpení. Reakční produkty se rozdělí na agarosovém gelu, DNA se převede na nylonovou membránu Duralon-UV a zkouší se za použití oligonukleotidů T3 a T7 jako sondy. Stanoví se velikost pásů a sestrojí se restrikní mapy.

Plasmid pSK/EF1.7 se sekvenuje s vnitřními primery původně zkonstruovanými pro PCR prohledávání (SEQ ID NO: 4 až 11 (dříve popsané primery 95-136 až 95-143)), čímž se ověří, že sekvencí genu je sekvence dříve identifikovaného proteinu. Stanoví se orientace kódující oblasti a sestrojí se další primery, které umožňují sekvenování k vnitřnímu místu NotI. Stanoví se sekvence celé kódující oblasti, která se poté porovná s předpokládanou sekvencí cDNA popsanou v Hayashi et al. (viz výše). Analýza sekvence potvrdí, že

izolovaná DNA skutečně kóduje stejnou sekvenci EF-1 α , jako DNA popsaná Hayashim (viz výše). Kromě toho je oblast prvního exonu identická s dříve publikovanou oblastí sekvence křeččí cDNA EF-1 α u 5' konce (Hayashi, viz výše) a bylo identifikováno sedm intronů, z čehož se zřejmě, že struktura se podává struktuře známé pro lidský homolog.

Sekvence a restrikční mapa získaná ze 7kb fragmentu ukazuje, že část 5' lemuujícího intronu a promotor jsou umístěny ve 12kb fragmentu od 5' do vnitřního místa NotI. Z 12kb insertu se vyšťepí SpeI/NotI 3kb fragment od 5' do vnitřního místa NotI a subklonuje do pBluescriptSK⁺ předem štěpeného stejnými enzymy. Výsledný plasmid se označí jako pSK/EF1.3. 3kb fragment se mapuje výše popsáním způsobem za použití KpnI a ClaI, čímž se potvrdí restrikční místa a sekvenuje za použití soupravy Erase-a-Base (Promega, Madison, WI, USA) za použití ClaI a KpnI míst pro vytvoření prodloužení 5' a 3'. Sekvenční analýza ukáže oblasti obsahující promotor, TATA box a 0,9kb intron v 5' netranslatované lemuující oblasti o stejné délce jako má první intron v lidském genu [Uetsuki, 1989, viz výše]. Sekvence CHEF1 promotoru a 5' intronu je uvedena v SEQ ID NO: 1, přičemž intron zahrnuje nukleotidy 2699 až 3641.

P ř í k l a d 3

Charakterizace regulační DNA CHEF

Sekvence před ATG start kodonem (včetně) křeččího genu EF-1 α je popsána v SEQ ID NO: 1. Většina identifikovatelných vazebných míst transkripčního faktoru se pravděpodobně vyskytuje od 3' do (protisměrně) SacI místa umístěného 1,56 kb od 5' do iniciačního ATG kodonu genu EF-1 α . Každý z expresních vektorů obsahuje sekvence CHEF1 popsané dále, avšak obsahuje také 2 kb CHEF1 sekvence od 5' k místu SacI.

Sekvenování ukáže přítomnost dokonale konsensuálního TATA boxu umístěného asi 1 kb od 5' směrem k iniciačnímu ATG start kodonu a oblast mezi protisměrně umístěním místem SacI a TATA boxem obsahuje řadu možných vazebných míst pro transkripční faktor [Boulikas, Crit. Rev. Euk. Gene Exp. 4: 117 až 321 (1994)], jako jsou místa Sp1 (SEQ ID NO: 16 nebo 17), místa ATF (SEQ ID NO: 18) a místa NF-1 (SEQ ID NO: 19).

GGCGGG	SEQ ID NO: 16
GGGCGG	SEQ ID NO: 17
TGACGY(C/A)R	SEQ ID NO: 18
TTGGCN _{5,6} (T/G)CCR	SEQ ID NO: 19

Podobně jako u lidského genu EF-1 α [Uetsuki et al., viz výše] se zde vyskytuje 943bp intron v 5' netranslatované oblasti (UTR) křeččího genu EF-1 α , což je zřejmé z umístění sestřihů donorní a akceptorní sekvence. Avšak za použití analytického programu Geneworks DNA bylo zjištěno, že sekvence intronu v 5' UTR je pouze ze 62 % identická se sekvencí v lidském genu. Intron 5' zahrnuje řadu možných vazebných míst pro transkripční faktory, který zhruba odpovídá počtu vazebných míst mezi místem SacI a TATA boxem, což ukazuje, že intron 5' by mohl být důležitý pro optimální transkripci řízenou promotorem EF-1 α .

Za použití analytického programu Geneworks DNA bylo zjištěno, že sekvence CHEF1 od restričního místa SacI (v protisměru) až do (ale ne včetně) intronu 5' (po směru) je ze 64 % shodná se sekvencí lidského EF-1 α . Porovnání umístění vazebných míst transkripčního faktoru Sp1 lidské a křeččí regulační sekvence je uvedeno v tabulce 1. Úplná sekvence lidského genu EF-1 α [Uetsuki et al., viz výše] je uvedena v SEQ ID NO: 29.

T a b u l k a 1

Vzdálenost míst Sp1 od TATA boxu

Křeček Poloha nukleotidu	Člověk Poloha nukleotidu
-424	-335
-304	-220
-183	-208
-171	432
-151	476
-135	573
-26	581
63	690
156	
168	
257	
261	
425	
495	
589	
594	
688	

P ř í k l a d 4

Konstrukce expresních plasmidů

Četné plasmidy, jichž se používá v následujících příkladech, byly získány dále popsánymi postupy.

Plasmid pSV2-dhfr (přírůstkové číslo ATCC 37146) se rozštěpí SphI/BamHI a 1,8kb fragment kódující dihydrofolát reduktasu (DHFR) se přečistí (fragment 1). Fragment kódující

DHFR také obsahuje sekvenci promotoru/operátoru SV40 umístěnou směrem k 5' a polyadenylační sekvenci umístěnou směrem 3' vzhledem k dhfr genu. Plasmid pSL1190 (Pharmacia) se rozštěpí HindIII, posunutě konce se doplní Klenowem a tupě zakončená DNA se znovu liguje, aby se eliminovalo místo HindIII, za vzniku plasmidu pSL1190H, který se poté štěpí SphI/BamHI a 3,4kb fragment se přečistí (fragment 2). 1,8kb fragment pSV2-dhfr (fragment 1) se liguje k 3,4kb fragmentu pSL1190H (fragmentu 2), čímž se získá plasmid pSL1190H-dhfr.

Plasmid pSL1190H-dhfr se modifikuje následujícím postupem, aby se z něj odstranilo několik restričních míst. Plasmid se nejprve štěpí XbaI/NheI (čímž se získají komplementární posunuté konce) a lineární plasmid se znovu liguje, čímž se odstraní obě místa XbaI a NheI. Při druhém postupu se pSL1190H-dhfr štěpí HindIII, posunutě konce se doplní Klenovovým fragmentem a lineární plasmid se znovu liguje, čímž se eliminuje HindIII místo. Při třetím postupu se pSL1190H-dhfr se štěpí BglII, posunutě konce se doplní Klenowem a lineární plasmid se znovu liguje, čímž se odstraní místo BglII. Výsledkem těchto tří stupňů je plasmid pSL1190H-dhfr/NXHB, z něhož byla odstraněna místa XbaI, NheI, HindIII a BglII. Plasmid pSL1190H-dhfr/NXHB se štěpí EcoRI/BamHI, insertuje se do něj linker NPB1/NPB2 (získaný anelací oligonukleotidů NPB1 a NPB2 [SEQ ID NO: 20 a 21]) za vzniku plasmidu pSL/dhfr/NotI, který má jedinečné restriční místo NotI.

NPB1 GATCGCGGCCGCGTTTAAACGGATCC (SEQ ID NO: 20)

NPB2 AATTGGATCCGTTTAAACGCGGCCGC (SEQ ID NO: 21)

Tento plasmid pSL/dhfr/NotI se štěpí Asp718/BamHI a 1,8kb fragment kódující DHFR se přečistí (fragment 3). Plasmid

pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA, USA) se štěpí Asp718/BglII, čímž se odstraní promotor CMV a polyadenylační DNA hovězího růstového hormonu (BGH) a 3,7kb fragment se přečistí (fragment 4). 1,8kb fragment pSL/dhfr/NotI kódující DHFE obsahující sekvenci promotoru/operátoru SV40 a polyadenylační sekvenci (fragment 3) se liguje k 3,7kb fragmentu pRc/CMV (fragmentu 4) za vzniku plasmidu pRc/DHFR/NotI.

Plasmid pRc/CMV se štěpí Asp718/XbaI a 0,8kb fragment kódující polyadenylační DNA BGH se přečistí (fragment 5). Plasmid pRc/DHFR/NotI se rozštěpí BamHI/Asp718 a 4kb fragment obsahující sekvence DHFR, promotoru/operátoru SV40 a polyadenylační sekvenci se přečistí (fragment 6). Plasmid pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) se štěpí BglII/SacI a 0,7kb fragment kódující promotor CMV se přečistí (fragment 7). 0,8kb fragment pRc/CMV (fragment 5), 4kb fragment pRc/DHFR/NotI (fragment 6), 0,7kb fragment pCEP4 (fragment 7) a fragment syntetického adaptoru SacI/XbaI se spojí čtyřcestnou ligací, čímž se získá plasmid pDC1. Adaptor se vytvoří anelací oligonukleotidů SXP1 a SXP2.

SXP1 (SEQ ID NO: 22)

5'-CGTTTAGTGAACCGTCAGATCTACATAACAACATTCCTC
CTCTAAAGAAGCCCCAAGCTTGATATCTGCAGAATTCT-3'

SXP (SEQ ID NO: 23)

5'-CTAGAGAATTCTGCAGATATCAAGCTTGGGGCTTCTTTAGAG
GAGGAATGTTGTTATGTAGATCTGACGGTTCATAAACGAGCT-3'

Plasmid pDC1 tedy obsahuje promotor CMV, oblast polylinkeru, polyadenylační místo z BGH a gen dhfr řízený promotorem SV40 a sekvencí SV40 sestřihu/polyadenylačního místa.

Plasmid pDC1 se štěpí XhoI a izoluje se 4,5kb fragment, který neobsahuje promotor CMV a polyadenylační DNA

20.10.99

BHG, který se liguje k plasmidu pDCi1. Plasmid pDCi1 se poté štěpí BamHI/XhoI a 4,5kb fragment se přečistí (fragment 8). 4,5kb fragment pDCi1 (fragment 8) se liguje k PCR fragmentu štěpenému BamHI/SalI kódujícímu částečnou sekvenci promotoru CMV získanou ze použití primerů 96-13 a 96-14 (plasmid pDC1, jako templát), čímž se získá plasmid pDCi2.

Primer 96-13

(SEQ ID NO: 24)

5'-AGTTCAGTCGACGGCGCGCCAACCCGGGAATCC
GGACGGGATCTATACATTGAATCAATATTGGCA-3'

Primer 96-14

(SEQ ID NO: 25)

ATGTCAGGATCCACGCGGAACTCCATATATGGGCTATGAACT

Plasmid pDCi2 se štěpí Asp718/SpeI a 4,2kb fragment kódující DHFR obsahující sekvenci promotoru/operátoru SV40 a polyadenylační sekvenci se purifikuje (fragment 9) a pDC1 se štěpí Asp718/SpeI a 1,5kb fragment obsahující částečnou DNA promotoru CMV s BGH polyadenylačními signály se purifikuje (fragment 10). 4,2kb fragment pDCi2 (fragment 9) se liguje k 1,5kb fragmentu pDC1 (fragmentu 10), čímž se získá plasmid pDC31. Plasmid pDC31 se od pDC1 liší tím, že obsahuje několik nových restrikčních míst, jako SmaI a AscI u 5' konce promotoru CMV, které byly vytvořeny. Plasmid pDC31 se štěpí NotI, posunutá DNA se otupí za použití polymerasy T4 a plasmid se znovu liguje, aby se vyloučilo místo NotI, čímž se získá plasmid pDC36. Plasmid pDC36 je stejný jako pDC31 s výjimkou místa NotI, které bylo zničeno.

Plasmid pDC36 se štěpí ApaI/BamHI, posunuté konce se doplní a plasmid se znovu liguje za vzniku pDC38. pDC38 je stejný jako pDC36, až na fragment ApaI/BamHI obsahující polyadenylační sekvenci hovězího růstového hormonu, která z něj byla odstraněna. Plasmid pDC38 se štěpí SmaI/HindIII a

4,6kb fragment, který neobsahuje DNA promotoru CMV, se purifikuje (fragment 11).

Plasmid pSK/EF1.3 se štěpí EcoRV/NotI/PvuI a 2,9kb fragment kódující sekveci promotoru CHEF1 a protisměrnou sekvencí DNA se purifikuje (fragment 12). Bluescript SW⁺II (pSK⁺) se štěpí NotI a 2,9kb fragment se purifikuje (fragment 13). 7kb NotI fragment z fágu lambda 7.4 se liguje k 2,9 pSK⁺ fragmentu (fragmentu 13), čímž se získá plasmid pSK/EF1.7.

Plasmid pSK⁺ se štěpí HindIII/NotI a 2,9kb fragment se purifikuje (fragment 14). Plasmid pSK/EF1.7 se štěpí NotI/NcoI a 620bp fragment kódující část 5' netranslatovaného intronu CHEF1 se purifikuje (fragment 15). 123bp PCR fragment štěpený HindIII/NcoI kódující zbývající 5' intron vytvořený za použití primerů 96-36 a 96-45 a pSK/EF1.12 jako templátu se přečistí (fragment 16).

Primer 96-36 (SEQ ID NO: 26)

GGCTTAGCTCCGAGGAGGG

Primer 96-45 (SEQ ID NO: 27)

CGTGACAAGCTTGGTTTTCAACAC

2,9kb fragment pSK⁺ (fragment 14), 620bp fragment pSK/EF1 (fragment 15) a 123bp fragment HindIII/NcoI (fragment 16) se ligují, čímž se získá plasmid pSK/5'EF-1 obsahující úplnou sekvenci 5' intronu CHEF1.

Plasmid pSK/5'EF-1 se štěpí HindIII/NotI a 0,7kb fragment kódující 5' intron se purifikuje (fragment 17). 4,6kb fragment pDC38 neobsahující promotor CMV (fragment 11), 2,9kb fragment pSK/EF1.3 obsahující sekvenci promotoru CHEF1 a protisměrnou sekvenci (fragment 12) a 0,7kb

pSK/5'EF-1 fragment kódující úplný 5' intron (fragment 17) se spojí při třícestné ligaci, čímž se získá plasmid pDEF1, který tedy obsahuje kompletní 5' regulační DNA CHEF1, gen dhfr a počátek replikace SV40, který umožní replikaci za vzniku velmi vysokého počtu kopií v buňkách transformovaných antigenem SV40 T.

Plasmid pDEF1 se štěpí HindIII, posunuté konce se doplní a plasmid se štěpí NotI. 2,6kb fragment obsahující kromě částečné sekvence 5' intronu sekvenci promotoru CHEF1 a protisměrnou sekvenci DNA se purifikuje (fragment 18). Plasmid pDEF1 se štěpí NotI/Asp718 a 1,3kb fragment kódující zbytek 5' intronu se purifikuje (fragment 19). Plasmid pDC38 se štěpí SmaI/Asp718 a 4kb fragment kódující DHFR obsahující sekvenci promotoru/operátoru SV40 a polyadenylační DNA se purifikuje (fragment 20). 2,6kb fragment pDEF1 (fragment 18), 1,3kb fragment pDEF1 (fragment 19) a 4kb fragment pDC38 (fragment 20) se spojí třícestnou ligací, čímž se získá plasmid pDEF2. Plasmid pDEF2 v E. coli kmene XL-1 Blue byl uložen 4. března 1997 ve sbírce American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA pod přírůstkovým číslem 98343. Plasmid pDEF2 se od pDEF1 liší v tom, že z něj byl odstraněn 0,3kb fragment HindIII/SpeI umístěný 2,3 kb proti směru od TATA boxu CHEF1 a že obsahuje pouze jedno místo HindIII umístěné v oblasti polylikeru. pDEF2 se použije v případech, kdy gen, který má být exprimován, obsahuje vlastní polyadenylační místo.

Za účelem linearizace se plasmid pDEF2 štěpí Asp718/XbaI, přičemž se však také odstraní počátek replikačních sekvencí a 7,4kb fragment se purifikuje (fragment 21). Plasmid pDC1 se štěpí Asp718/XbaI a 0,8kb fragment, který kromě polyadenylačních sekvencí BGH obsahuje záměnu počátku nebo replikační DNA, se purifikuje (fragment 22). 7,4kb fragment pDEF2 (fragment 21) a 0,8kb fragment pDC21

(fragment 22) se spojí za vzniku plasmidu pDEF10, který se liší od pDEF1 stejným způsobem jako pDEF2. Plasmid pDEF10 se od pDEF2 liší v tom, že v pDEF10 u 3' konci oblasti polylinkeru je polyadenylační místo z genu hovězího růstového hormonu.

Plasmid pDEF10 se štěpí HindIII/XbaI za účelem linearizace a 8,2kb fragment se purifikuje (fragment 23). Plasmid pDC1/MDC, plasmid kódující chemokin odvozený od chemokinu lidského makrofágu (MDC) se štěpí HindIII/XbaI, a 0,4kb fragment kódující MDC se purifikuje (fragment 24). Ligací 8,2kb fragmentu pDEF10 (fragmentu 23) s 0,4kb fragmentem pDC1/MDC (fragmentem 24) se vyrobí plasmid pDEF10/MDC.1.

Plasmid pRc/CMV se štěpí BamHI, posunuté konce se doplní Klenowem, plasmid se štěpí Asp718, a 1,5kb fragment se purifikuje (fragment 25). Plasmid pDC1 se štěpí NotI, posunuté konce se doplní Klenowem, plasmid se štěpí Asp718, a 3,9 kbfragment se purifikuje (fragment 26). 1,5kb fragment pRc/CMV (fragment 25) se liguje s 3,9kb fragmentem pDC1 (fragmentem 26), čímž se získá plasmid pNCX.

Plasmid pNCX se podobá pDC1 s tou výjimkou, že dhfr gen je nahrazen genem resistance vůči neomycinu (NeoR). Plasmid pNCX se štěpí Asp718/PvuI, a 2,1kb fragment se purifikuje (fragment 27). Plasmid pDEF1 se štěpí Asp718/PvuI, a 5,9kb fragment se purifikuje (fragment 28). 2,1kb fragment pNXC (fragment 27) se liguje do 5,9kb fragmentu pDEF1 (fragmentu 28) za vzniku plasmidu pNEF1. pNEF1 se liší od pDEF1 tím, že nese bakteriální gen resistance vůči neomycinu (NeoR), který kóduje resistenci vůči neomycinu nebo G418. Geny, které mají být insertovány do pNEF1 jsou obecně fragmenty HindIII/XbaI, které se insertují po částečném

štěpení HindIII nebo třícestné ligaci, jelikož plasmid obsahuje dvě místa HindIII.

P ř í k l a d 5

Transfekce buněk DG44 a zkouška produktivity

Za účelem transfekce hostitelských buněk DG44 jediným plasmidem se obvykle linearizuje 50 až 100 µg plasmidu štěpením restriční enzymem PvuI nebo AscI. Při transfekci, kdy se mají do buněk CHO zavádět dva plasmidy, se plasmidy ponechají neštěpené. Před transformací se plasmidy vysrážejí ethanolem a promyjí dvakrát 70% ethanolem. DNA pelety se krátce suší a resuspendují ve 400 µl sterilní destilované vody. K resuspendované DNA se přidá 400 µl sterilního 2X HeBS (40mM HEPES-hydroxid sodný, pH 7,0; 274mM chlorid sodný; 10mM chlorid draselný; 1,4mM hydrogenfosforečnan sodný; 12mM dextrosa). Netransfekované buňky DG44 se kultivují v médiu DMEM/F-12 doplněném hypoxanthinem (na konečnou koncentraci 0,01mM) a thymidinem (na konečnou koncentraci 0,0016mM), také označovaným jako HT. Za účelem pěstování netransfekovaných i transfekovaných buněk DG44 se k médiu přidá dialyzované FBS do konečné koncentrace 5 až 10 % objemových. Buňky DG44 se připraví na transfekci tak, že se kultury nechají růst do asi 50% nebo nižší konfluence v 150cm² ošetřených polystyrenových nádobách pro tkáňovou kultivaci (Corning). Buňky se z plastu odstraní tak, že se nejprve odsaje médium a ulpělé buňky se promyjí jednou solným fosfátovým pufovacím roztokem bez vápníku a hořčíku (CMF-PBS: 2,7mM chlorid draselný; 1,5mM dihydrogenfosforečnan draselný; 137mM chlorid sodný a 8,1mM hydrogenfosforečnan sodný), přidají se k nim 4 ml roztoku obsahujícího 0,0125% ozářený trypsin (Worthington Biochemical Corporation) v CMF-PBS a inkubují se několik minut při 37°C. K buňkám se přidá médium (4 ml) obsahující

hovězí fetální sérum (FBS), stanoví se koncentrace buněk a alikvoty 2×10^7 buněk se peletizují centrifugací. Každá buněčná peleta se promyje jednou v CMF-PBS a resuspenduje v 0,8 ml roztoku obsahujícího HeBS s požadovanou plasmidovou DNA. Resuspendované buňky se při teplotě místnosti převedou do 0,4cm kyvety Gene Pulser (Bio-Rad) a umístí do elektroporačního zařízení Bio-Rad GenePulser. Buňky se elektroporují při teplotě místnosti s vybíjením kondenzátoru 290 V a 960 μ F (puls 9 až 11,5 ms). Buňky se asi 10 minut ponechají v kyvetě a poté přidají do 10 ml DMEM/F-12 doplněného 5 až 10% dialyzovaným FBS a HT. Poté se stanoví úmrtnost (vyloučení trypanové modři), která je obvykle asi 50 %. Buňky se peletizují centrifugací, pelety se resuspendují ve 2 ml DMEM/F-12 doplněném 5 až 10% dialyzovaným FBS a HT ("neselektivní médium") a zaočkují na 10cm polystyrenové misky pro tkáňovou kultivaci. Po dvoudenním růstu se buňky, v tuto dobu obvykle konfluentní, z misek odstraní za použití trypsinu, jak je popsáno výše a v různých zředěních v DMEM/F-12 doplněném 5 až 10% dialyzovaným FBS a bez HT ("selektivní médium") zaočkují na 10cm² misky. Pět a devět dní poté k buňkám přidá selektivní médium. Po asi 2 týdnech se kolonie transfektantu (obvykle více než 1000 na každou transfekci) z misek odstraní za použití trypsinu, výše popsaným způsobem a po přidavku selektivního média se stanoví koncentrace buněk. Alespoň dva alikvoty 2×10^6 buněk na každou transfekci se přidají k 10cm miskám obsahujícím 10 ml selektivního média. Buňky se nechají růst až do zániku, kdy je většina buněk odpojena od desky vlivem přeplnění. Supernatant ze zaniklých kultur se zkouší metodou ELISA, čímž se stanoví průměrný titr produktu.

P ř í k l a d 6

Produkce rekombinantního proteinu za použití CHEF1

Buňky DG44 popsané v příkladu 5 se transfekují plasmidy nesoucími geny uvedenými v tabulce 3 operativně připojenými k regulační DNA CHEF1. Bakteriální kmeny transformované plasmidy kódujícími každý z genů, kterých bylo použito při zkoušce, byly uloženy ve sbírce American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 1. dubna 1997 pod přírůstkovými čísly uvedenými v tabulce 2.

T a b u l k a 2

Přírůstková čísla plasmidů

Kódovaný gen	Označení plasmidu	Přírůstkové číslo
Těžkého řetězce protilátky ICM3	pDEF1/ICM3H.2	98381
Lehkého řetězce protilátky ICM3	pNEF1/ICM3L.3	98382
Těžkého řetězce protilátky 23F2G	pDEF1/F2GH.1	98383
Lehkého řetězce protilátky 23F2G	pNEF1/F2GL.1	98384
Chitinasy	pDEF1/CTN.1	98385
Acetylhydrolasy aktivačního faktoru destiček (PAF-AH)	pDEF2/HPH.4	98386
Chemokinů odvoze- ného od makrofágu (MDC)	pDEF10/MDC.1	98387

Po selekci na transfektanty se spojené kolonie (vice než 200) z každé transfekce odstraní z misek za použití trypsinu a stejný počet buněk z každé transfekce se nanese na misky a nechá růst do úhynu. Supernatanty se odstraní a exprese proteinu se stanovuje za použití metody ELISA nebo enzymového stanovení. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

T a b u l k a 3

Expresa proteinu za použití regulačních sekvencí CHEF1 a CMV

Transfekovaný gen	Titr proteinu	
	CMV	CHEF1
ICM3 H+L	554	1862
ICM3 H+L	288	2153
Hu23F2G H+L	337	1848
MDC	360	2100
PAF-AH	590	6574
Chitinasy-1	3200	2300
Chitinasy-2	8900	12850

S výjimkou první zkoušky na expresi chitinasy (v tabulce 3 označena jako chitinasa-1) se za použití regulační DNA CHEF1 dosáhne významně vyšších úrovní produkce proteinu, které jsou třikrát až jedenáctkrát vyšší, než při expresi s promotorem CMV.

Za účelem stanovení, zda se u snížené exprese, která byla zjištěna u zkoušky na chitinasu, jedná o abnormální nebo o opakovatelný výsledek, který by byl charakteristický a/nebo jedinečný pro chitinasu, se zkouška zopakuje, avšak za použití dvou oddělených transfekcí, na rozdíl od jediné transfekce použité při první zkoušce, jejímž výsledkem byl

neobvykle nízký počet získaných transfektantů. Kromě toho se použije jiné zkoušky na aktivitu chitinasy, u níž se prokázalo, že je přesnější než postupy použité při první zkoušce.

Výsledkem transfekcí při druhé zkoušce je počet transfektantů, který je konsistentnější s předchozími výsledky dosaženými za použití plasmidu pDEF2, který při dalších zkouškách produkuje více než 150 % počtu transfektantů dosaženého s plasmidem CMV. Výsledky z druhého pokusu (označeného v tabulce 3 jako chitinasa-2) jsou vnitřně konsistentní, což zvyšuje důvěryhodnost výsledků, přestože zjištěné zvýšení exprese proteinu (asi 1,4x), ve srovnání s expresí za použití promotoru CMV, je nižší než zvýšení zjištěná u ostatních proteinů zkoušených dříve.

P ř í k l a d 7

Produkce rekombinantního proteinu za použití regulační DNA
CHEF1 o různých délkách

Zkonstruuje se expresní vektor obsahující dalších 8 kb 5' lemující DNA z genu EF-1 α a označí se jako pDEF14. Plasmid pDEF14 se od pDEF2 liší v tom, že pDEF14 obsahuje přibližně 11,7 kb DNA lemující 5' křeččího EF-1 α , zatímco pDEF2 obsahuje pouze 3,3 kb této sekvence. Plasmid pDEF14 také obsahuje 4 kb křeččí 3' lemující DNA přiléhající k 3' konci DHFR expresní kazety. Větší plasmid pDEF14 se konstruuje způsobem, který je stručně popsán dále.

Z pDEF2 se odstraní 2,6kb AscI/NotI fragment CHEF1 a na jeho místo se insertuje 11kb AscI/NotI fragment CHEF1. Inerce delší sekvence nejprve vyžaduje modifikaci XbaI místa umístěného 11,7 kb od 5' směrem k iniciačnímu ATG EF-1 α na místo AscI. Kromě toho se insertuje 4kb NsiI/SalI fragment s tupými konci, který je tvořen lemující sekvencí

20.10.99

CHEF1 s začínající u NsiI místa 118 párů bází od 3' ke stop kodonu EF-1 α , do PmeI/SalI místa 3' k DHFR expresní kazetě umístěné na 3' konci oblasti polylinkeru, do jíž jsou insertovány geny, které mají být exprimovány. Úplná 3' DNA sekvence s počátkem při stop kodonu genu EF-1 α je uvedena v SEQ ID NO: 28. Bakterie transformovaná tímto plasmidem byla uložena ve sbírce American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 9. dubna 1997 pod přírůstkovým číslem 98398. Výsledný plasmid pDEF14 obsahuje jedinečná XbaI a NotI místa spolu s mnohačetnými HindIII místy a inserce genu do tohoto plasmidu za účelem exprese tedy vyžaduje třicestnou ligaci. Tak například gen může být insertován do plasmidu ligací HindIII/XbaI fragmentu obsahujícího požadovaný gen se 737bp NotI/HindIII fragmentem z pDEF14 a 19,7kb XbaI/NotI fragmentem z pDEF14.

Exprese proteinu za použití tohoto vektoru se porovná s expresí za použití vektoru pDEF2, který obsahuje menší část 5' lemuující oblasti EF-1 α . Při předchozích zkouškách byla DNA kódující těžký i lehký řetězec protilátky 23F2G subklonována do vektorů pDEF2 a pDEF14 a úrovně exprese stanovené po transfekci do buněk DG44 jsou popsány výše v příkladu 5. Geny kódující oba řetězce protilátky se ve vektorech umístí lineárně a exprese obou genů se pohání sekvencí CHEF1 v jednotlivých plasmidech. Kódující oblasti pro dva řetězce v každém plasmidu se rozdělí identickou 4,3kb DNA odvozenou z 3' netranslatované oblasti lidského IgG4.

Výsledky ukazují, že exprese 23F2G z větší CHEF1 sekvence je v pDEF14 čtyřnásobně větší, než exprese protilátky z menší sekvence pDEF2. Tento výsledek je překvapující vzhledem k tomu, že většina identifikovatelných vazebných míst transkripčního faktoru pDEF14 je také v sekvenci DNA v pDEF2. Je tedy možné, že v DNA CHEF1 v plasmidu pDEF14 je

20.10.99

umístěno jedno nebo více dalších a neidentifikovaných vazebných míst transkripčního faktoru nebo sekvencí zesilovačů. Jinak řečeno, větší DNA CHEF1 může poskytovat výhodu zvýšené transkripce díky určité vlastnosti 3' DNA sekvence.

Odborníkům v tomto oboru budou zcela jistě zřejmé četné modifikace vynálezu, jak je popsán a ilustrován v předcházejícím textu. Takové modifikace a změny nepředstavují únik z rozsahu tohoto vynálezu, který je dán pouze patentovými nároky.

20.10.99

SEKVENČNÍ PROTOKOL

(1) OBECNÉ INFORMACE:

- (i) PŘIHLAŠOVATEL: Allison, Daniel S.
- (ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Transkripční regulační DNA křeččího EF-1 α
- (iii) POČET SEKVENCÍ: 29
- (iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:
 - (A) ADRESÁT: Marshall, O'Toole, Gerstein, Murray & Borun
 - (B) ULICE: 233 South Wacker Drive, 6300 Sears Tower
 - (C) MĚSTO: Chicago
 - (D) STÁT: Illinois
 - (E) ZEMĚ: USA
 - (F) ZIP: 60606
- (v) POČÍTAČOVĚ ČITELNÁ FORMA:
 - (A) TYP MÉDIA: Floppy disk
 - (B) POČÍTAČ: IBM PC compatible
 - (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, verze #1.30
- (vi) ÚDAJE O SOUČASNÉ PŘIHLÁŠCE:
 - (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY:
 - (B) DATUM PODÁNÍ:
 - (C) ZATŘÍDĚNÍ:
- (viii) INFORMACE O ZÁSTUPCI:
 - (A) JMÉNO: KAREL ČERMÁK, AKP ČERMÁK-HOŘEJŠ-VRBA,
NÁRODNÍ 32, 110 01 PRAHA 1
 - (C) ČÍSLO SPISU: 01-11-99-ČE
- (ix) TELEKOMUNIKAČNÍ SPOJENÍ:
 - (A) TELEFON: 312-474-6300
 - (B) TELEFAX: 312-474-0448

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:1:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 3678 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:1:

20.10.99

ACTAGTTCCA AAGATGAATT ACTAACCAGT GTTCCAAGG AAATAAATGA AAGCAGAGAG	60
ATTAGTTCTA TTGCTAGTGT TTCATTTTCG TATATTTCTT ACAATTTCTC TTGTTACAAA	120
TAGGCACTAG GGTATCAAGA TAATTTTAAC GACTGGCTGA GAACCCTAGA AAATCTCTGT	180
GAAAAAGGGA TTTGTGAAAT GAGAGAGGGT AATGTGGCCA TTATAGAAAA GGCTTTTGTC	240
TGCCTTGTCAT GCATAGACCC TGTGTTTGAT CTCTTAACAC CCTCCTTGAC CAGAAAAAGC	300
TTCTGTGGAT AGAAAATGAT TAGTTATATA TACTTTTAGG GAAACGTAGT TCTGGATTCT	360
TTGGTTACAA TTAACAGAAT TAAGTGCAA CAAAGCCAGA AACCTCCTGA TAAATGAGAA	420
AACCTGCTTG TAGAAGGTTG TAAGGCTCTG TAATATAGGA ATTAGGAGAA AAGAAACCTG	480
TGTGGTGGGG CACGTCTGTA ATCCCAGCAT TGGGAAGTAG AGGTAGAAGA TTAGAAATCA	540
AAGGCCAGCC TCAGCAACAC AGTGAGTTTG AGGCCACCCT GAACTACATC AGGTTCTGTC	600
TCCTTTCTTT TTTTTTTTTT TTTCTTTTCT TTTTTTGGTT TCTCTGTGTA GTTTTGGAGC	660
CTATCCTGGC ACTAGCTCTG AAGAGCAGGC TGGCCTCGAA CTCAGAGATC AGCCAGCCTC	720
TGCTGGGATT AAAGGTATGC ACCACCAACG CCCCAGGTTT TGTCTCAAAC AAACAAAAAT	780
AACATCAGGA GGTGGTGAGA GGGCTCAGTG GTCACAGGCA TTCTCTGCAA AGCCTGACTC	840
TGAGTTGGAT CCTTTAGAGC TACATGGTTG AGGGAAGAGA ACTGACTCCT GGAAGGTGTC	900
CTCTGGTCCC CACACATAGC TATACACAGC ATGTGCATTC ACACACACTA AATAATGCTA	960
TTTTTAACAAA AATTAAAAAC AACAAACAGTT TGGGTTGTGA AACTAGAAC TAGATAATAG	1020
GTAAGAATCA AGTATCATGT AAATTTGCTT TCAACTCATC CAAAATTTG TTTTATATTT	1080
CAGTTTTTTT CCTTCCTAGC TTGACTGTGG AGTCTTGTC GGAAGCAAAT AGTTCCTTTG	1140
CAGATCCCAC ATGTGGACAC CGGACAGTAG GTCCTCAAAT GCTCCTTATT AGGTTGGTTC	1200
AATAATATCA ATTGTTTGTT ACTAGGCAGT GATGTTGTAC ATCTGGAGGA GATCTCTTGA	1260
CCCCATAATC AGGTTATTAG GAATAAATAC TCTAAGGCTA AAAATGTAGC TTAGTGATAA	1320
GAGTGCTTGC CTGGTGTGCT GAGACCCTCG GTTCCATCTC CACAACCCCA TATTCCATTA	1380
CAAAATACCT TTTCACCGTC CCTAGCATTA AGAAACAAAA CAACAAAGAA GTTTTTCTTT	1440
CTTCTGAGAT CCTGCCCCGA GAGGCATTTA AACTGGCCA GGGCCAAAAA AAAAAAAAAA	1500
AAAAGAAAAA AAAGAAAAGA AAACAGGCTA GGGCCGGCAT GGTGGCGCAC GCCTTTAATC	1560

20.10.99

CCAGCACGCA GGAGGCAGAG GCAGGGCGGA TCTCTGTGAG TTTGAGGTCA GCCTGGTCTA	1620
CCTAGTGAGT TTCAGGGCAC CCAGGGCTAA AGAGACTGTC TCAAAAACAA AACAGCCACA	1680
CAATCAGAAC CACAGCAAAA CGCAGTTATG ATCCTTGGA CTGTAGGAAT GACAAGCATT	1740
TAAATAATAG GACGAGCCAT TTTTGAGAAG CTCTGATTTC ACAAGTGTC GGGATGGGCT	1800
CTGGGCGAGT AAGATTGCTA ATGCTGGCCT CTAAATGAGA CCACGTGGAG TTGATTAGAT	1860
TCTTTTCATG TTCCTCGTGC TCTATCAAAT AACTGTACCC AAATACACAC ACACACACAC	1920
ACACACACAA TGCGCGCACA CACAAAATCC TTTTTTAGCT TAAGAAGCCC AGAATCAGAA	1980
GTAAAGCTAA CTGTGGGACT TAAGTATTAT TCTGAACGGA ACTCCCAGGG CGTGAAGCGC	2040
GCTTCAGGCT TCCAGAGAAG CAGCTGGCGC TGGATGGAAT GAACCAAGAG GCCAGCACAG	2100
GGGCAGATCC GTCGAGCTCT CGGCCACCGA GCTGAGCCCT TAGGTTCTGG GGCTGGGAAG	2160
GGTCCCTAGG ATTGTGCACC TCTCCGCGG GGGACAAGCA GGGGATGGCG GGGCTGACGT	2220
CGGGAGGTGG CCTCCACGGG AAGGGACACC CGGATCTCGA CACAGCCTTG GCAGTGGAGT	2280
CAGGAAGGGT AGGACAGATT CTGGACGCCC TCTTGGCCAG TCCTCACCGC CCCACCCCCG	2340
ATGGAGCCGA GAGTAATTCA TACAAAAGGA GGGATCGCCT TCGCCCCTGG GAATCCCAGG	2400
GACCGTCGCT AAATTCTGGC CGGCCTCCCA GCCCGAACC GCTGTGCCCC CCCAGCGCGG	2460
CGGGAGGAGC CTGCGCCTAG GCGGATCGC GGGTCGGCGG GAGAGCACAA GCCACAGTC	2520
CCCCGCGGTG GGGGAGGGG GCGCTGAGCG GGGGCCCGG AGCCAGCGCG GGGCAAACCTG	2580
GGAAAGTGGT GTCGTGTGCT GGCTCCGCC TCTTCCCGAG GGTGGGGGAG AACGGTATAA	2640
AAGTGCGGTA GTCGCGTTGG ACGTTCTTTT TCGCAACGGG TTTGCCGTCA GAACGCAGGT	2700
GAGTGGCGGG TGTGGCCTCC GCGGGCCCG GCTCCCTCCT TTGAGCGGGG TCGGACCGCC	2760
GTGCGGGTGT CGTCGGCCGG GCTTCTCTGC GAGCGTTCCC GCCCTGGATG GCGGGCTGTG	2820
CGGGAGGGCG AGGGGGGGAG GCCTGGCGGC GGCCCCGGAG CCTCGCCTCG TGTCGGGCGT	2880
GAGGCCTAGC GTGGCTTCCG CCCC GCCGCG TGCACCGCG GCCGCGCTTT GCTGTCTGCC	2940
CGGCTGCCCT CGATTGCCTG CCCGCGGCC GGGCCAACAA AGGGAGGGCG TGGAGCTGGC	3000
TGGTAGGGAG CCCCCTAGTC CGCATGTCGG GCAGGGAGAG CGGCAGCAGT CGGGGGGGGG	3060
ACCGGGCCCC CCCGTCCCGC AGCACATGTC CGACGCCGCC TGGACGGGTA GCGGCCTGTG	3120

TCCTGATAAG GCGGCCGGGC GGTGGGTTTT AGATGCCGGG TTCAGGTGGC CCCGGGTCCC	3180
GGCCCGGTCT GGCCAGTACC CCGTAGTGGC TTAGCTCCGA GGAGGGCGAG CCCGCCCGCC	3240
CGGCACCAGT TGCGTGCGCG GAAAGATGGC CGCTCCCGGG CCCTGTAGCA AGGAGCTCAA	3300
AATGGAGGAC GCGGCAGCCC GCGGAGCGG GCGGGTGAG TCACCCACAC AAAGGAAGAG	3360
GGCCTTGCCC CTCGCCGGCC GCTGCTTCCT GTGACCCCGT GGTGTACCGG CCGCACTTCA	3420
GTCACCCCGG GCGCTCTTTC GGAGCACCGC TGGCCTCCGC TGGGGGAGGG GATCTGTCTA	3480
ATGGCGTTGG AGTTTGCTCA CATTTGGTGG GTGGAGACTG TAGCCAGGCC AGCCTGGCCA	3540
TGGAAGTAAT TCTTGGAATT TGCCCATTTT GAGTTTGGAG CGAAGCTGAT TGACAAAGCT	3600
GCTTAGCCGT TCAAAGGTAT TCTTCGAACT TTTTTTTTAA GGTGTTGTGA AAACCACCGC	3660
TAATTCAAAT CCAACATG	3678

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:2:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:2:

AGGCACAGTC GAGGCTGATC	20
-----------------------	----

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:3:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:3:

TTCCAGGGTC AAGGAAGGCA	20
-----------------------	----

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází

- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:4:

GCCACCTGAT CTACAAATGT

20

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:5:

GAGATACCAG CCTCAAATTC

20

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:6:

ATGTGACCAT CATTGATGCC

20

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:7:

GTGACTTTC ATCCCTTGAA

20

20.10.99

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:8:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:8:

GTTGGAATGG TGACAACATG

20

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:9:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:9:

CAGGTTTTAA AACACCAGTC

20

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:10:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:10:

AATGACCCAC CAATGGAAGC

20

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:11:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

20.10.99

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:11:

ACAGCAACTG TCTGCCTCAT

20

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 17 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:12:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 19 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:13:

GGAAACAGCT ATGACCATG

19

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:14:

AATTAACCCT CACTAAAGGG

20

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

20.10.99

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:15:

GTAAATACGA CTCACTATAG GGC

23

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 6 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:16:

GGCGGG

6

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 6 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:17:

GGGCGG

6

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 8 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:18:

TGACGYMR

8

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:19:

20.10.99

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 13 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:19:

TGGCNNNNNKCCR

13

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:20:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 26 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:20:

GATCGCGGCC GCGTTTAAAC GGATCC

26

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:21:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 26 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:21:

AATTGGATCC GTTTAAACGC GGCCGC

26

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:22:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 77 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:22:

20.10.99

CGTTTAGTGA ACCGTCAGAT CTACATAACA ACATTCCTCC TCTAAAGAAG CCCCAAGCTT 60
GATATCTGCA GAATTCT 77

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:23:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 85 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO:23:

CTAGAGAATT CTGCAGATAT CAAGCTTGGG GCTTCTTAG AGGAGGAATG TTGTTATGTA 60
GATCTGACGG TTCACTAAAC GAGCT 85

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:24:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 66 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO:24:

AGTTCAGTCG ACGGCGGCC AACCCGGGAA TCCGGACGGG ATCTATACAT TGAATCAATA 60
TTGGCA 66

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:25:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 42 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO:25:

ATGTCAGGAT CCACGCGGAA CTCCATATAT GGGCTATGAA CT 42

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:26:

20.10.99

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 19 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:26:

GGCTTAGCTC CGAGGAGGG

19

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:27:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 26 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:27:

CGTGACAAGC TTGGTTTTCA CAACAC

26

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:28:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 4263 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:28:

TGAATATTAC CCCTAACACC TGCCACCCCA GTCTTAATCA GTGGTGGAAG AACGGTCTCA	60
GAAGTGTGTTG TCTCAATTGG CCATTTAAGT TTAATAGTGA AAGACTGGTT AATGATAACA	120
ATGCATCGGA AAACCTTCAG GAGGAAAGGA GAATGTTTTG TGGAACATTT TTGTGTGTGT	180
GGCAGTTTTA AGTTATTAGT TTTCAAAATC AGTACTTTTTT AATGGAAACA ACTTGACCAA	240
AAATCTGTCA CAGAATTTTG AGACCCATTA AAATACAAGT TTAATGAGAA GTCTGTCTCT	300
GTTAATGCTG AAGTCATTAC TAAGTGCTTA GCTTAGCAAG GTATGTGGAT GCCCATTTGT	360
GTTCCAAGGG ATTGGACTGT TCATCAGGAC CCAGAGCTGA GTTTCAAGGG CTCAAGAGAT	420

20.10.99

GGCTTATTAC CTGTGGGTGT CTTGAAGGTT CTGGTTGGGA CAAATTAGGA ATGTTTTTGG	480
CAGACATGGT GACTACCTTC ATCTGGGTGA GTTCAGTTGA TTTGTCTTGA GCCTTTGGGG	540
TTTACACAAG TAAATGACAT CATAAGTTA GTGTATTGTT AGTGAATATT AATATATGAG	600
GCAGGCTTTG CTCTAGCAAT TTTAGAACTA GTTTTCAGGA AAGGGTTCAT CTTGTGCATT	660
GGATGTTTGA TTCTATCACT TAGAGTTTAA ACTGAAAGTG CTCAAGAGGT TTTATTTAGG	720
CTGGGATATA AATAAGCCTT TCTGTAGCTT GTAATGGTAT CAGGAATTTA AAAGGCCATC	780
TGGGGCACAA AGATTAAGCA GAAAAGGTAG AAGGTGAGAT TGGGGGACTT TGAGTACTTC	840
ACACACTTTA ATGTGTGAGT GCTTTAGTGC ATATAGTACA ACTGCCAGAT AAGGGCATCC	900
ACATCTGATT GTTTGGAAGG CACCTTGTGG TTTCTGGGAA TTCAGAATTG GGAGAAAAAT	960
GCTCCCAACC GCTGAAGCCC TTGGTAATCT GCAGGGTGTT TATTTAGCAG GAGATAAGGA	1020
CAAAAAGTTA TAGTGTGGAG TTGGTTGAGT TGGTAGATGT CATTACAACA GGTGGTCTTA	1080
AATTGGGTTA GGAGTCACTT TGAAATACCT GGGCCATAAG CAAAGTGGCA TTTTCACCTT	1140
TCAGGAGAAA CTGGTACACT TATCCATTCT ATAGTGCATG CTTGTTCAAT TGGGCTGATG	1200
ACTAAACCGG TGAATAAGG TTTGTCAGTA TAAATGGATG GGTTGTAGGC AGACGGTGAG	1260
GAATTACTAT ACCTGCAAGG AGTCATTGCC TGATCTGCCT GGAAAGGGGC AGGATTGAGT	1320
CTCAGAACGT GTACACCATA GGATATGGAA AAATTTGTCA CGCCTAGCAT TCAACTTAGT	1380
GGTGTAGCGC CACCTACTGG CACTTTAAAA GCTTAGCATA GAGGAGCATG TGTGTTAGGA	1440
GCTCGGATGG GATCCAGGGC CTCAAGGTTT GCATGTAAAT AAAAGCCCTT TACCAAATTA	1500
ACTACATACC AGCATAATC AGTCCTTTAG TGTTGAAAAA CAGAAGGGAA AGCTAATATA	1560
TATAGTGCTT GCTTTATTTA AGTCTAGCTG ATTACGTGTT TGGTTGCCAG TGTGACTAGT	1620
CTGGAGTTGA ATTTGTCCTC AGACACGTAA AATGGAATTT GGGATTCACA AACTCTAGT	1680
ATGAGGGACC TAATGGCCTG TACCAGGCAC AAACGTGTCT ATAAACTACA CAAAACGAAG	1740
GAATTTACAG GAATTAGGAA GGTATTCTTA ACATTAAAC ATTATGGGCA TTTTAAAAAA	1800
AGCTTTGACA GGATTCTTTT GTCATGGCTG TCCTGGAGCT AGTTGTGTAG ACCAGGCTGG	1860
GCTGAAATCT TGTCTGCCTG CCTGGCTTGG AACTTTTTTT ATTATGTATA CAACATTCTG	1920
CTTCCATGTA TATCTGCACA TTAGAAGACG GCACCAGATC TCCTAATGGA TGGTTGTGAG	1980

20.10.99

CCACCATGTG GTTGCTGGGA ATTGAACTCA GGACCTCTGG AAGAGCAGTG CTCTTAACCT	2040
CTGAGCCATC TCCAGCCCCA GCTTGGGCAC ATTTTAAATG GCTGGGAAAT CAAACCCCCT	2100
AGGCCTTCTG TCAGTAATGA AGGGCTTTTG GCTACCGAGA GTAGGATTTA AGGTTATTCTG	2160
GAGCTGCAGG TCTGCCTCAG TGCAGGTTTG GGAGTCCAGC ATCTTAGAAA ATGCAGTGAA	2220
GCCAAGCTGA GCTATATTTT GTTTAAAAAA AAAATAAGTG GGTAAAGTGC TGCTGAGCCT	2280
GATGACCAAG CTGGGACACA AGTAGAAGAA CATAGGCCAA TGCTCTATAT TAAAAGCATG	2340
GGTCATTTTT AATGCTCTTG AGAAGGCTAT GCCTACACTA CTCTCAGCCA CCGCAGCGTG	2400
TTTAAATTAA ACTAGTTTGG AAATTTTCTT TGGGGGTAAG CTATTTAACC TAGTGCCTTG	2460
GCAGGTATAC TACTGAACTC TCCTCCTCAT TCCTTTTTGT TTTTAAAGAA TTTCAGTCAG	2520
GCTCAGGCAG CCCTTAAACT TGTGATTAAG CCTGAGAACA GTTACGATTA TGAGCCTATT	2580
AGTATACCGA TCAATATGTG AATTTTTTTG GGATGGGGGT CAGGCCTCCC TGCCTCCCAA	2640
ATACTGGGAC TAAAGGCTGC ACCACCACAA CCTGGCTCTT GAAATACTTT TCTACATTTT	2700
TTGGGGGGCA TGGGTGGGAG AGCAGGGTTT CTCTGTATTA GCCCTGGCTC TCCTGGAAC	2760
CTGTAGACCA GGCTATTCTT GAGCTCAGAT TAGCCTGTCT CTGCCTCCTA AATTCTGGGA	2820
TTAAAGGTGT GTGCTACTGC TGCCTGGCTA CAAAGACATT TTTTTTTTTC TTAAATTTAA	2880
AAACAAAAGT GGTTCCTTTA GAAGGGTGGT TGGTGTGGC ACATACTCCA AGCACTCAGG	2940
TTTTGAGTTT GTCCCAGGAA TGAAGACTGC ATTACTGCCG CCCCTCCCTG GTAAGGGCTA	3000
CACAGAGAAA TCCTATTTGG AGCCTATCCT GGTAACCTCGC TCTGTAGACC AGGCTGGCCT	3060
CGAACTCAAG AGAACCACCT GCCTCTGAAT GCTGGTATTA AGGGCAGGCA CCACCAACAC	3120
CCAGCCTAAA AAATGTCTTT TTTTAAAGA TTTTTTTTTT TTTTTTTACA GAATAAACAT	3180
TCTGTTTACA ATATTCTGCT TCTATGTATA TCTGCACACT AGAAGAGGGC ACCCGATCTC	3240
ATAATGGATG GTTGTGAGCC ACCAAGTGGT TGCTGGGAAT TGAAGTCAGA ACCTCTGGAA	3300
GAGCAGTCAG TGCTCTTAAC CTCTGAGCCA TCTCTCCAGC CCCTAAAAAT GGCTCTTGAG	3360
ATAGGGTCTC AAGTAGTTTG AGACTGAGTT GGCTATATAA ACAAGGCTGG CACATAGCAC	3420
CATGTACAGC TGGGTTTAGT TTACATGGGG TGTTTTTGTC TCTGGAGGCA GGAGGATCAT	3480
TTGAGCATAG GGAGTTAATA GTGAGGTCAT GTTTTATCTA CTCTTCTGAA TTGAGAACTA	3540

AGCTGATGCA AAGCAAGTTT GACTGAAGAA GTCCAGTTTA TGAGAACAAG GGTGGAAACT	3600
AATGTGTCAA AGATGGCCTT GCATGTGTTT TAGATGATGA CCCAGTCACT TGGGAATTAC	3660
TGGATGTGTA AGACCTATAT CTTGACAGGA GTGAACAGTG TCTTATAGGT CCTATATGAA	3720
AGAAATGAGA CATACCCATT TTGTTTCCCC TAAGAATTCA CTTTTCCTAA CCTGGTTCAT	3780
GCTATTTAGG TTATTTTACT TGCAAATCCT AGGTGCTCCC TTACCCAGTA TTGCTTATGT	3840
GGCACCAAAG TCACTCACTC CCATGATTTG CAAGTCTCTG GGAACCTCCA TGACAACCTA	3900
GAATAGCAAC TCAAATACAT TTTCTCAGTA CCAATTTTGA AGAAAAATA TTTTGCAAAA	3960
TAGCTGTATG GATGGGTACT AAATAGTGAG GTTATCTCCA GAAGGCCTAT GAAGAATTAA	4020
GGTTGAGTTC AGTTGAGTTC AGCAGCAAGT TTAAGGTTCA TCCATTTTTG TACAGTGTTT	4080
TCCTATTACG GTAAGTGTTT TGCCTGCAGG AATATCTGTA CCACATGCTT GCCTGGTACC	4140
TATATCGGCC AGAAGAGGGC TTTGGATCCT CTGGACTTGA ATTACAGATG GGTATTAGCC	4200
ACCATTTAGG TGCTGGGAAT TGAAACCAAG TCCTCTGGAA GAACAGCAAG TGATCGAGTC	4260
GAC	4263

(2) ÚDAJE K SEQ ID NO:29:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 4695 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:29:

CCCCGGCTGG GCTGAGACCC GCAGAGGAAG ACGCTCTAGG GATTTGTCCC GGACTAGCGA	60
GATGGCAAGG CTGAGGACGG GAGGCTGATT GAGAGGCGAA GGTACACCCT AATCTCAATA	120
CAACCTTTGG AGCTAAGCCA GCAATGGTAG AGGGAAGATT CTGCACGTCC CTTCCAGGCG	180
GCCTCCCCGT CACCACCCCC CCCAACCCGC CCCGACCGGA GCTGAGAGTA ATTCATACAA	240
AAGGACTCGC CCCTGCCTTG GGAATCCCA GGGACCGTCG TTAAACTCCC ACTAACGTAG	300
AACCCAGAGA TCGCTGCGTT CCCGCCCCCT CACCCGCCCG CTCTCGTCAT CACTGAGGTG	360

GAGAAGAGCA TGCCTGAGGC TCCGGTGCCC GTCAGTGGGC AGAGCGCACA TCGCCACACAG	420
TCCCCGAGAA GTTGGGGGGA GGGGTCGGCA ATTGAACCGG TGCCTAGAGA AGGTGGCGCG	480
GGGTAAACTG GGAAAGTGAT GTCGTGTACT GGCTCCGCCT TTTTCCCGAG GGTGGGGGAG	540
AACCGTATAT AAGTGCAGTA GTCGCCGTGA ACGTTCTTTT TCGCAACGGG TTTGCCGCCA	600
GAACACAGGT AAGTGCCGTG TGTGGTTCCC GCGGGCCTGG CCTCTTTACG GGTTATGGCC	660
CTTGCGTGCC TTGAATTACT TCCACGCCCC TGGCTGCAGT ACGTGATTCT TGATCCCGAG	720
CTTCGGGTTG GAAGTGGGTG GGAGAGTTCG AGGCCTTGCG CTTAAGGAGC CCCTTCGCCT	780
CGTGCTTGAG TTGAGGCCTG GCCTGGGCGC TGGGGCCGCC GCGTGCGAAT CTGGTGGCAC	840
CTTCGCGCCT GTCTCGCTGC TTTGATAAG TCTCTAGCCA TTTAAAATTT TTGATGACCT	900
GCTGCGACGC TTTTTTTCTG GCAAGATAGT CTTGTAAATG CGGGCCAAGA TCTGCACACT	960
GGTATTTTCGG TTTTTGGGGC CGCGGGCGGC GACGGGGCCC GTGCGTCCCA GCGCACATGT	1020
TCGGCGAGGC GGGGCTGCG AGCGCGGCCA CCGAGAATCG GACGGGGGTA GTCTCAAGCT	1080
GGCCGGCCTG CTCTGGTGCC TGGCCTCGCG CCGCCGTGTA TCGCCCCGCC CTGGGCGGCA	1140
AGGCTGGCCC GGTCGGCACC AGTTGCGTGA GCGGAAAGAT GGCCGCTTCC CGGCCCTGCT	1200
GCAGGGAGCT CAAAATGGAG GACGCGGCGC TCGGGAGAGC GGGCGGGTGA GTCACCCACA	1260
CAAAGGAAAA GGGCCTTTCC GTCCTCAGCC GTCGTTTCAT GTGACTCCAC GGAGTACCGG	1320
GCGCCGTCCA GGCACCTCGA TTAGTTCTCG AGCTTTTGGA GTACGTCGTC TTTAGGTTGG	1380
GGGGAGGGGT TTTATGCGAT GGAGTTTCCC CACACTGAGT GGGTGGAGAC TGAAGTTAGG	1440
CCAGCTTGGC ACTTGATGTA ATTCTCCTTG GAATTTGCCC TTTTGTAGTT TGGATCTTGG	1500
TTCATTCTCA AGCCTCAGAC AGTGGTTCAA AGTTTTTTTC TTCCATTTCA GGTGTCGTGA	1560
AAACTACCCC TAAAAGCCAA AATGGGAAAG GAAAAGACTC ATATCAACAT TGTCGTCATT	1620
GGACACGTAG ATTCGGGCAA GTCCACCACT ACTGGCCATC TGATCTATAA ATGCGGTGGC	1680
ATCGACAAAA GAACCATTGA AAAATTTGAG AAGGAGGCTG CTGAGGTATG TTTAATACCA	1740
GAAAGGGAAA GATCAACTAA AATGAGTTTT ACCAGCAGAA TCATTAGGTG ATTTCCCCAG	1800
AACTAGTGAG TGGTTTAGAT CTGAATGCTA ATAGTTAAGA CCTTACTTAT GAAATAATTT	1860
TGCTTTTGGT GACTTCTGTA ATCGTATTGC TAGTGAGTAG ATTTGGATGT TAATAGTTAA	1920

20.10.99

GATCCTACTT ATAAAAGTTT GATTTTTGGT TGCTTCTGTA ACCCAAAGTG ACCAAAATCA	1980
CTTTGGACTT GGAGTTGTAA AGTGGAAACT GCCAATTAAG GGCTGGGGAC AAGGAAATTG	2040
AAGCTGGAGT TTGTGTTTTA GTAACCAAGT AACGACTCTT AATCCTTACA GATGGGAAAG	2100
GGCTCCTTCA AGTATGCCTG GGTCTTGGAT AAAGTGAAG CTGAGCGTGA ACGTGGTATC	2160
ACCATTGATA TCTCCTTGTC GAAATTTGAG ACCAGCAAGT ACTATGTGAC TATCATTGAT	2220
GCCCCAGGAC ACAGAGACTT TATCAAAAAC ATGATTACAG GGACATCTCA GGTGTTGGATT	2280
AATAATTCTA GGTTCCTTTA TCCCCAAAGG CTGCTTTGT AACTGGTTT TGTCATTTGG	2340
AGAGTTGACA GGGATATGTC TTTGCTTCTT TAAAGGCTG ACTGTGCTGT CCTGATTGTT	2400
GCTGCTGGTG TTGGTGAATT TGAAGCTGGT ATCTCCAAGA ATGGGCAGAC CCGAGAGCAT	2460
GCCCTTCTGG CTTACACACT GGGTGTGAAA CAACTAATTG TCGGTGTTAA CAAAATGGAT	2520
TCCACTGAGC CACCCTACAG CCAGAAGAGA TATGAGGAAA TTGTTAAGGA AGTCAGCACT	2580
TACATTAAGA AAATTGGCTA CAACCCCGAC ACAGTAGCAT TTGTGCCAAT TTCTGGTTGG	2640
AATGGTGACA ACATGCTGGA GCCAAGTGCT AACGTAAGTG GCTTCAAGA CCATTGTTAA	2700
AAAGCTCTGG GAATGGCGAT TTCATGCTTA CACAAATTGG CATGCTGTG TTTGAGATGC	2760
CTTGGTTCAA GGGATGGAAA GTCACCCGTA AGGATGGCAA TGCCAGTGGA ACCACGCTGC	2820
TTGAGGCTCT GGAATGCATC CTACCACCA CTCGTCCAAC TGACAAGCCC TTGCGCTGC	2880
CTCTCCAGGA TGTCTACAAA ATTGGTGGTA AGTTGGCTGT AAACAAAGTT GAATTTGAGT	2940
TGATAGAGTA CTGTCTGCCT TCATAGGTAT TTAGTATGCT GTAAATATTT TTAGGTATTG	3000
GTAAGTTTCC TGTTGGCCGA GTGGAGACTG GTGTTCTCAA ACCCGGTATG GTGGTCACCT	3060
TTGCTCCAGT CAACGTTACA ACGGAAGTAA AATCTGTGCA AATGCACCAT GAAGCTTTGA	3120
GTGAAGCTCT TCCTGGGGAC AATGTGGGCT TCAATGTCAA GAATGTGTCT GTCAAGGATG	3180
TTCGTCGTGG CAACGTTGCT GGTGACAGCA AAAATGACCC ACCAATGGAA GCAGCTGGCT	3240
TCCTGCTCA GGTAACAATT TAAAGTAACA TTAAGTTATT GCAGAGGCTA AAGTCATTTG	3300
AGACTTTGGA TTTGCACTGA ATGCAAATCT TTTTCCAAG GTGATTATCC TGAACCATCC	3360
AGGCCAAATA AGCGCCGGCT ATGCCCTGT ATTGGATTGC CACACGGCTC ACATTGCATG	3420
CAAGTTTGCT GAGCTGAAGG AAAAGATTGA TCGCCGTTCT GGTAAAAAGC TGGAAGATGG	3480

20.10.99

CCCTAAATTC TTGAAGTCTG GTGATGCTGC CATTGTTGAT ATGGTTCCTG GCAAGCCCAT	3540
GTGTGTTGAG AGCTTCTCAG ACTATCCACC TTTGGGTAAG GATGACTACT TAAATGTAAA	3600
AAAGTTGTGT TAAAGATGAA AAATACAACCT GAACAGTACT TTGGGTAATA ATTAACTTTT	3660
TTTTTAATAG GTCGCTTTGC TGTTCGTGAT ATGAGACAGA CAGTTGCGGT GGGTGTCATC	3720
AAAGCAGTGG ACAAGAAGGC TGCTGGAGCT GGCAAGGTCA CCAAGTCTGC CCAGAAAGCT	3780
CAGAAGGCTA AATGAATATT ATCCCTAATA CCTGCCACCC CACTCTTAAT CAGTGGTGGA	3840
AGAACGGTCT CAGAACTGTT TGTTTCAATT GGCCATTTAA GTTTAGTAGT AAAAGACTGG	3900
TTAATGATAA CAATGCATCG TAAAACCTTC AGAAGGAAAG GAGAATGTTT TGTGGACCAC	3960
TTTGGTTTTT TTTTTGCGT GTGGCAGTTT TAAGTTATTA GTTTTTAAAA TCAGTACTTT	4020
TTAATGGAAA CAACTTGACC AAAAATTTGT CACAGAATTT TGAGACCCAT TAAAAAGTT	4080
AAATGAGAAA CCTGTGTGTT CCTTTGGTCA ACACCGAGAC ATTTAGGTGA AAGACATCTA	4140
ATTCTGGTTT TACGAATCTG GAAACTTCTT GAAAATGTAA TTCTTGAGTT AACACTTCTG	4200
GGTGGAGAAT AGGGTTGTTT TCCCCCACA TAATTGGAAG GGAAGGAAT ATCATTTAAA	4260
GCTATGGGAG GGTTCCTTTG ATTACAACAC TGGAGAGAAA TGCAGCATGT TGCTGATTGC	4320
CTGTCACTAA AACAGGCCAA AAAGTGAATC CTTGGGTGTC ATAGAAAGCT TCATGTTGCT	4380
AAACCAATGT TAAGTGAATC TTTGGAAACA AAATGTTTCC AAATTACTGG GATGTGCATG	4440
TTGAAACGTG GGTAAAAATG ACTGGGCAGT GAAAGTTGAC TATTTGCCAT GACATAAGAA	4500
ATAAGTGTAG TGGCTAGTGT ACACCCTATG AGTGGAAGGG TCCATTTTGA AGTCAGTGGA	4560
GTAAGCTTTA TGCCATTTTG ATGGTTTCAC AAGTTCTATT GAGTGCTATT CAGAATAGGA	4620
ACAAGGTTCT AATAGAAAAA GATGGCAATT TGAAGTAGCT ATAAAATTAG ACTAATTACA	4680
TTGCTTTTCT CCGAC	4695

20.10.99

PV 180-99

hust

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Purifikovaná a izolovaná DNA obsahující transkripční regulační DNA křeččího EF-1 α .
2. DNA podle nároku 1, kde uvedená regulační DNA obsahuje sekvenci nukleové kyseliny uvedenou v SEQ ID NO:1.
3. DNA podle nároku 1, kde regulační DNA obsahuje část sekvence nukleové kyseliny uvedené v SEQ ID NO: 1, která je schopna podporovat transkripci genu operativně připojeného k regulační DNA.
4. DNA podle nároku 3, kde regulační DNA obsahuje oblast od nukleotidu přibližně 2114 do nukleotidu přibližně 3656 sekvence uvedené v SEQ ID NO: 1.
5. Hostitelská buňka obsahující DNA podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde uvedená DNA není operativně připojena k EF-1 α kódujícím sekvencím.
6. Vektor obsahující DNA podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde uvedená DNA není operativně připojena k EF-1 α kódujícím sekvencím.
7. Hostitelská buňka transformovaná nebo transfe-kovaná vektorem podle nároku 6.
8. Chimérický polynukleotid zahrnující regulační DNA křeččího EF-1 α operativně připojenou k DNA sekvenci kódující protein, kterážto sekvence DNA kóduje protein odlišný od křeččího EF-1 α .

20.10.99

9. Chimérický polynukleotid podle nároku 8, kde regulační DNA obsahuje sekvenci nukleové kyseliny uvedenou v SEQ ID NO: 1.

10. Chimérický polynukleotid podle nároku 8, kde regulační DNA obsahuje část sekvence nukleové kyseliny uvedené v SEQ ID NO: 1, kterážto část je schopna podporovat transkripci genu operativně připojeného k regulační DNA.

11. Chimérický polynukleotid podle nároku 10, kde regulační DNA obsahuje oblast od nukleotidu přibližně 2114 do nukleotidu přibližně 3656 sekvence nukleotidů uvedené v SEQ ID NO:1.

12. Chimérický polynukleotid podle nároku 8, kde uvedená sekvence DNA kódující protein kóduje protein endogenní vzhledem ke křeččím buňkám, který je odlišný od EF-1 α .

13. Chimérický polynukleotid podle nároku 8, kde sekvence DNA kóduje protein heterologní vzhledem ke křeččím buňkám.

14. Hostitelská buňka transformovaná nebo transfe-kovaná chimérickým polynukleotidem podle kteréhokoliv z nároků 8 až 13.

15. Expresní plasmid obsahující chimérický polynukleotid podle kteréhokoliv z nároků 8 až 13.

16. Expresní plasmid podle nároku 15, který dále obsahuje sekvenci nukleové kyseliny uvedenou v SEQ ID NO:28.

17. Expresní plasmid podle nároku 16, kde sekvence nukleové kyseliny uvedená v SEQ ID NO:28 je umístněna 3' vzhledem k chimérickému polynukleotidu.

18. Hostitelská buňka transformovaná nebo transfe-
kovaná expresním plasmidem podle nároku 15.

19. Hostitelská buňka transformovaná nebo transfe-
kovaná expresním plasmidem podle nároku 16 nebo 17.

20. Plasmid pDEF2.

21. Plasmid pDEF14.

22. Plasmid pDEF1./ICM3H.2.

23. Plasmid pNEF1/ICM3L.3.

24. Plasmid pDEF1/F2GH.1.

25. Plasmid pNEF1/F2GL.1.

26. Plasmid pDEF1/CTN.1.

27. Plasmid pDEF2/HPH.4.

28. Plasmid pDEF10/MDC.1.

29. Hostitelská buňka transformovaná nebo trans-
fekovaná expresním plasmidem podle kteréhokoliv z nároků 20
až 28.

30. Způsob zvyšování transkripce genu, který je
předmětem zájmu, v hostitelské buňce, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že se DNA obsahující křeččí EF-1 α re-

20.10.99

gulační DNA integruje do genomové DNA uvedené hostitelské buňky v poloze operativně připojené ke genu, který je předmětem zájmu.

31. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m , že DNA, která má být integrována, dále zahrnuje zaměřovací sekvenci.

32. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m , že hostitelskou buňkou je buňka vaječníku čínského křečka.

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že gen, který je předmětem zájmu, je endogenní vzhledem k hostitelské buňce vaječníku čínského křečka.

34. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m , že požadovaný gen je heterologní vzhledem k buňkám vaječníku čínského křečka a je stabilně integrován do genomové DNA buněk vaječníku čínského křečka.

01-11-99-Če